



**Luís Filipe Trindade Levita Quilhó**

Licenciado em Engenharia de Produção Industrial

**Produção de Bioetanol a partir de  
Materiais Lenho-celulósicos de Sorgo Sacarino:  
Revisão Bibliográfica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Energia e Bioenergia

Orientador: Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes  
Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes  
Arguente: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando  
Vogal: Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa  
Vogal: Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro, 2011



**Título:** Produção de Bioetanol a partir de Materiais Lenho-celulósicos de Sorgo  
Sacarino: Revisão Bibliográfica.

**Autor:** Luís Filipe Trindade Levita Quilhó

**Contacto do Autor:** luis.quilho@gmail.com

*O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.  
Não é autorizada a cópia, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação.  
É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da  
respectiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais de citação de  
trabalhos científicos.  
Copyright*

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Nuno Lapa, Professor Auxiliar da UNL-FCT, pela sua orientação e empenho que dedicou a este trabalho, pela sua disponibilidade e abertura a todas as dificuldades.

Ao Professor José Monteiro, Professor Adjunto da ESA-IPCB, por todo o tempo que me dedicou, e por ter partilhado comigo os seus conhecimentos.

À Professora Doutora Benilde Mendes, Professora Associada da UNL-FCT, pelas palavras de apoio e motivação, pela sua dedicação e empenho, que manteve ao longo de todo o Mestrado.

A todo o corpo docente do Mestrado em Energia e Bioenergia, que tornaram o estudo e a pesquisa, deste universo de conhecimento, tão gratificante.

Aos meus pais, Maria Santos e Manuel Quilhó, por terem dado todo o seu infinito apoio, e por nunca terem deixado de acreditar.

À minha irmã Cristina e ao meu cunhado Patrício, pela companhia e moral, que tanta falta fizeram.

À minha sobrinha e afilhada Mariana, e ao meu sobrinho João Pedro, por obrigarem a esforçar-me por um futuro melhor.

A todos os meus amigos, por me fazerem acreditar, nos momentos em que foi mais necessário.

À gerência da empresa Albigel, por ter gentilmente cedido um espaço, com condições incomparáveis, para desenvolver grande parte deste trabalho.

A todos, muito obrigado!



## RESUMO

O bioetanol de 2ª geração apresenta-se como uma alternativa aos biocombustíveis de 1ª geração, uma vez que é produzido a partir de materiais cuja utilização não compete com o uso humano ou animal. Por esse motivo, assumem cada vez mais importância os materiais lenho-celulósicos como matéria-prima para obter os açúcares necessários ao processo de fermentação.

O sorgo sacarino é uma planta que apresenta boas características de adaptabilidade a vários climas e tipos de solos e, além do facto de ser uma cultura rica em açúcar, o bagaço, resíduo produzido após a extracção dos açúcares, pode constituir uma fonte de materiais lenho-celulósicos para a produção de bioetanol.

Na presente dissertação foram analisados os resultados obtidos por vários trabalhos, cujo objecto de estudo foi o bagaço de sorgo sacarino, submetendo-o aos processos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

Foi possível identificar resultados de conversão de cerca de 99% de celulose em glicose, após pré-tratamento alcalino, e uma taxa de recuperação total de açúcares (glicose e xilose) de 90%, após pré-tratamento com água líquida sobreaquecida.

Em termos de resultados de fermentação, foi possível identificar um resultado de produção de 97%, face ao máximo teórico, de conversão de açúcares em bioetanol, após fermentação simultânea de pentoses e hexoses, tendo sido previamente submetidas ao pré-tratamento com explosão de fibras com amoníaco.

O conjunto de informação reunido nesta dissertação pode servir de base para futuras pesquisas acerca das potencialidades do bagaço de sorgo sacarino para a produção de bioetanol de 2ª geração.

Palavras-chave: Sorgo sacarino, Bagaço, Bioetanol, Materiais lenho-celulósicos, Pré-tratamento, Hidrólise, Fermentação.





## **ABSTRACT**

Second generation bioethanol represents an alternative to the first generation biofuels, since it is produced from raw materials that do not compete with human and animal use. For that reason, lignocellulosic materials play an increasing role as a raw material to obtain the necessary sugars needed in fermentation processes.

Sweet sorghum is a plant that shows good adaptability to a wide range of climatic conditions and soil types and, beyond the fact that this is a culture rich in sugar, it is also possible to use the lignocellulosic materials from its bagasse to produce bioethanol.

Results from several studies, that had in common the study of sweet sorghum bagasse for bioethanol production, were reviewed in this dissertation, in order to analyze what happens in each of the processes involved: pretreatment, hydrolysis and fermentation.

Around 99% conversion of cellulose to glucose was possible after alkaline pretreatment, and 90% total sugars recovery after liquid hot-water pretreatment.

As for fermentation, it was found that it is possible to get 97% ethanol production, when compared with its maximum theoretical value, after ammonia fiber explosion pretreatment.

The set of information and results gathered in this dissertation could be used as a basis for further research about the potentiality of sweet sorghum bagasse for 2<sup>nd</sup> generation bioethanol production.

**Keywords:** Sweet sorghum, Bagasse, Bioethanol, Lignocellulosic materials, Pretreatment, Hydrolysis, Fermentation.



# ÍNDICE DE MATÉRIAS

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 ENQUADRAMENTO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 BIOETANOL.....</b>	<b>2</b>
2.1 Definição.....	2
2.2 A importância do bioetanol como biocombustível.....	3
2.3 Panorama mundial, europeu e nacional.....	4
2.4 O bioetanol de 2ª geração.....	7
<b>3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LENHO-CELULÓSICOS.....</b>	<b>8</b>
3.1 Materiais lenho-celulósicos.....	8
3.1.1 Celulose.....	8
3.1.2 Hemicelulose.....	10
3.1.3 Lenhina.....	11
3.2 Tecnologias de Pré-tratamento.....	11
3.2.1 Pré-tratamentos físicos.....	12
3.2.2 Pré-tratamentos físico-químicos.....	13
3.2.3 Pré-tratamentos químicos.....	17
3.2.4 Pré-tratamentos biológicos.....	20
3.3 Hidrólise de Materiais Lenho-celulósicos.....	23
3.3.1 Hidrólise química.....	24
3.3.2 Hidrólise Enzimática.....	25
3.4 Fermentação.....	27
3.4.1 Microrganismos envolvidos na fermentação de etanol.....	28
3.4.2 Estratégias de Hidrólise e de Fermentação.....	31
<b>4 SORGO SACARINO.....</b>	<b>32</b>
4.1 Generalidades.....	32
4.2 Características botânicas.....	33
4.2.1 Sistemática.....	33
4.2.2 Morfologia.....	34
4.3 Características biológicas.....	36
4.4 Requisitos agronômicos.....	37
4.4.1 Temperatura.....	37
4.4.2 Solos.....	37
4.4.3 Fertilizantes.....	37
4.4.4 Sementeira.....	38
4.4.5 Irrigação.....	38

<b>4.5</b>	<b>Operações de colheita e processamento .....</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Produtividade da biomassa.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Interesse como cultura energética .....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LENHO-CELULÓSICOS DO SORGO SACARINO PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeitos dos pré-tratamentos.....</b>	<b>44</b>
5.1.1	Explosão a vapor.....	45
5.1.2	Pré-tratamento alcalino .....	46
5.1.3	Pré-tratamento ácido.....	48
5.1.4	Pré-tratamento com ALS.....	49
5.1.5	Pré-tratamento com AFEX .....	50
<b>5.2</b>	<b>Efeitos da hidrólise enzimática .....</b>	<b>52</b>
5.2.1	Hidrólise após pré-tratamento com explosão a vapor .....	52
5.2.2	Hidrólise após pré-tratamento alcalino.....	54
5.2.3	Hidrólise após pré-tratamento com ALS .....	56
5.2.4	Hidrólise após pré-tratamento com AFEX.....	58
5.2.5	Comparação global dos resultados obtidos nos diferentes processos de pré-tratamentos e hidrólises .....	59
<b>5.3</b>	<b>Fermentação de bagaço de sorgo sacarino .....</b>	<b>59</b>
5.3.1	Fermentação da Glicose .....	60
5.3.2	Fermentação da Xilose .....	62
5.3.3	Co-Fermentação da Glicose e Xilose .....	63
5.3.4	Comparação global dos resultados obtidos nos processos de fermentação ...	63
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Produção mundial de bioetanol 2000-2010. ....	4
Figura 2.2 – Produção de biocombustíveis na União Europeia 2000-2010. ....	6
Figura 2.3 – Produção de biocombustíveis em Portugal 2000-2010. ....	6
Figura 3.1 – Polímero linear de moléculas de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta$ -1,4 .....	9
Figura 3.2 – Estrutura hierárquica da madeira de espruce.....	9
Figura 3.3 – Representação de um segmento de xilano. ....	10
Figura 3.4 – Estrutura de uma partícula de capim .....	11
Figura 3.5 – Processos globais de hidrólise e fermentação de celulose e hemicelulose .....	23
Figura 4.1 – Distribuição da área de cultivo de sorgo em 1999-2001. ....	32
Figura 4.2 – Variedades principais de <i>S. bicolor</i> cultivadas. ....	33
Figura 4.3 – Secção transversal do caule de Sorgo sacarino. ....	34
Figura 4.4 – Panícula de Sorgo sacarino.....	35
Figura 4.5 – Produtividades de sorgo em função da data de sementeira. ....	40
Figura 4.6 – Esquema de valorização energética do sorgo sacarino para a produção de bioetanol. ....	42
Figura 5.1 – Efeito do pré-tratamento AFEX na concentração de glicose e de xilose. ....	51
Figura 5.2 – Efeito do pré-tratamento AFEX na concentração de glicose e de xilose, presente no bagaço de sorgo sacarino após lavagem.. ....	51
Figura 5.3 – Evolução da concentração de glicose e de xilose, após pré-tratamento com explosão a vapor. ....	53
Figura 5.4 – Efeito da separação da fracção líquida na hidrólise do bagaço de sorgo sacarino, pré-tratado com explosão a vapor. ....	54
Figura 5.5 – Hidrólise enzimática e fermentação do bagaço de sorgo sacarino, sem pré-tratamento, e após pré-tratamento alcalino. ....	55
Figura 5.6 – Taxa de conversão de glucano em glicose, após 24 h, do bagaço de duas variedades de sorgo sacarino após pré-tratamento alcalino. ....	56
Figura 5.7 – Digestibilidade enzimática sob diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de sorgo sacarino. ....	57

Figura 5.8 – Digestibilidade enzimática do bagaço de sorgo sacarino após 48 h, na presença de várias concentrações de $\text{CuCl}_2$ .	58
Figura 5.9 – Performance da <i>K. marxianus</i> CECT 10875 na SFS, a 42 °C, concentração de substrato de 10 % (w/v).	60
Figura 5.10 – Máxima produção de bioetanol (% do valor teórico). (A) Sem pré-tratamento, (B) Pré-tratamento com NaOH, (C) Pré-tratamento com NaOH + ultra-sons, (D) Pré-tratamento com ácido fosfórico, (E) Pré-tratamento com ácido fosfórico + ultra-sons	62

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição de algumas matérias lenho-celulósicas, em % do total do peso seco.	8
Tabela 3.2 – Vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento de biomassa lenho-celulósica.....	22
Tabela 3.3 – Características importantes para o processo de fermentação de bioetanol.....	29
Tabela 4.1 – Produção de sorgo sacarino em várias localidades de Espanha. ....	39
Tabela 4.2 – Comparação de parâmetros de cultivo de diferentes culturas sacarinas. ....	41
Tabela 4.3 – Composição de alguns materiais lenho-celulósicos (%).....	43
Tabela 5.1 – Variação dos rácios e quantidades da celulose e da hemicelulose, após o pré-tratamento com explosão a vapor. ....	46
Tabela 5.2 – Variação dos rácios e quantidades de lenhina, hemicelulose e celulose, após o pré-tratamento alcalino.....	47
Tabela 5.3 – Variação dos rácios e quantidades de lenhina, hemicelulose e celulose, após o pré-tratamento ácido. ....	48
Tabela 5.4 – Grau de dissolução da Hemicelulose e da Celulose, após pré-tratamento com água líquida sobreaquecida .....	50
Tabela 5.5 – Taxas de conversão de açúcares após pré-tratamento.....	59
Tabela 5.6 – Rendimentos de fermentação de bagaço de sorgo sacarino em bioetanol. ....	63





## LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX – Ammonia Fiber Expansion (Explosão de Fibras com Amoníaco).

ALS – Água Líquida Sobreaquecida.

bs – base seca.

I&D – Investigação e Desenvolvimento.

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico.

ms – matéria seca.

SFS – Sacarificação e Fermentação Simultâneas.

v/v – solução expressa em unidades volúmicas de soluto, por unidade volúmicas de soluto.

w/v – solução expressa em unidades de massa de soluto, por unidade volúmicas de soluto.



# 1 ENQUADRAMENTO

O bioetanol é o biocombustível que é produzido em maior quantidade no mundo (AIE, 2010). O seu papel como uma alternativa aos combustíveis fósseis assume uma importância cada vez maior no sector dos transportes. Em processos industriais actualmente implementados, o bioetanol é produzido a partir de culturas agrícolas ricas em açúcar, tal como é efectuado em grande escala no Brasil, utilizando a cana-de-açúcar, ou utilizando culturas ricas em amido, como por exemplo, nos Estados Unidos da América, com o milho (AIE, 2008b).

Com a crescente necessidade de se identificarem matérias-primas alternativas, que não entrem em competição com a utilização para a alimentação humana ou animal, grande parte da pesquisa científica está focalizada na produção de biocombustíveis de 2ª geração, nos quais se inclui o bioetanol produzido a partir de materiais lenho-celulósicos.

Os materiais lenho-celulósicos são constituídos por polímeros de moléculas de açúcares que, após processamento, poderão ser submetidos aos processos de fermentação convencionais, dando origem a bioetanol. No entanto, esta tecnologia ainda se encontra em fase de investigação e desenvolvimento, havendo ainda limitações ao nível do conhecimento científico que permita identificar condições que tornem esta tecnologia economicamente viável (AIE, 2008a).

É neste contexto que o sorgo sacarino surge como uma cultura energética, que apresenta potencialidades interessantes, uma vez que possui na sua constituição três grupos de materiais susceptíveis de serem fermentados em bioetanol – os açúcares (no caule), o amido (nos grãos), e os materiais lenho-celulósicos (bagaço resultante após extracção do açúcar). Além disso, como cultura, o sorgo sacarino apresenta uma gama alargada de requisitos que o podem tornar produtivo em climas temperados e mediterrânicos.

A necessidade de desenvolver processos industriais mais eficientes, quer sejam em termos económicos, sociais ou ambientais, dão ênfase à importância de áreas de estudo relacionadas, tais como a integração de processos e o conceito de biorefinaria, no âmbito dos quais se pretende maximizar a eficiência energética e o aproveitamento de materiais valorizáveis.

Nesta dissertação pretende-se efectuar uma revisão bibliográfica sobre o potencial do sorgo sacarino como cultura energética, os processos que estão envolvidos na produção de bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos, bem como os resultados apresentados nalguns estudos sobre a utilização dos materiais lenho-celulósicos de sorgo sacarino, para a produção de bioetanol.

## 2 BIOETANOL

### 2.1 Definição

O termo bioetanol, tal como definido na Directiva 2003/30/CE, de 08 de Maio de 2003, pode definir-se como sendo o «etanol produzido a partir da biomassa, e/ou da fracção biodegradável de resíduos, para utilização como biocombustível».

Neste trabalho consideraram-se igualmente as seguintes definições, indicadas na Directiva Europeia 2009/28/CE, de 23 de Abril de 2009, que veio revogar a anterior:

*Biocombustíveis:* os «combustíveis líquidos ou gasosos para o transporte, produzidos a partir da biomassa»;

*Biomassa:* a «fracção biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fracção biodegradável dos resíduos industriais e urbanos».

A produção de bioetanol, a partir de processos industrialmente implementados, utiliza matérias-primas vegetais ricas em açúcares, como é o caso da cana-de-açúcar ou da beterraba sacarina, ou a partir de culturas ricas em amido, como é o caso do milho ou do trigo. Após a sua extracção, estes glúcidos são submetidos a um processo de fermentação (sendo necessário um processo prévio de hidrólise no caso do amido), produzindo-se bioetanol, resultante do metabolismo dos microrganismos envolvidos.

O bioetanol produzido a partir de matérias-primas derivadas de culturas alimentares, como é o caso das culturas sacarinas e amiláceas, classificam-se de biocombustíveis de 1ª geração. Nesta classe inclui-se, igualmente, o biodiesel produzido a partir de culturas oleaginosas como, por exemplo, a soja.

Muitas análises indicam que a produção e utilização de biocombustíveis de 1ª geração, ao longo do seu ciclo de vida, apresentam um benefício em termos de reduções das emissões de gases com efeito de estufa e também em termos do balanço energético, quando comparados com a produção e utilização de combustíveis fósseis (AIE, 2008a). No entanto, a produção de bioetanol de 1ª geração tem levantado questões relativas ao seu impacto no aumento do preço dos alimentos, uma vez que competem com a utilização humana e animal. Além disso, as matérias-primas necessitam de terrenos agrícolas que são potencialmente utilizáveis para a produção de alimentos e de ração, o que pode conduzir a um aumento da necessidade de maiores áreas de cultivo, podendo provocar a conversão de vastas áreas

florestais em terrenos agrícolas, pondo em risco a sustentabilidade de ecossistemas e de comunidades (AIE, 2008a).

Neste contexto, têm-se efectuado pesquisas que possam conduzir à diversificação das matérias-primas para a produção de bioetanol, tendo sido dada grande relevância aos materiais lenho-celulósicos presentes nas espécies vegetais. Estes materiais, ricos em polímeros de monossacarídeos, apresentam-se como fonte potencial de açúcares para o processo de fermentação. O bioetanol produzido a partir destas matérias-primas enquadra-se na classificação de biocombustível de 2ª geração, uma vez que a sua produção não exige a utilização de matérias primas que competem com a alimentação humana, ou animal.

## **2.2 A importância do bioetanol como biocombustível**

Actualmente, o sector dos transportes é responsável por cerca de 25% das emissões globais de CO<sub>2</sub>, relacionadas com o consumo de combustíveis fósseis, e é igualmente responsável pelo consumo de cerca de 50% do petróleo (AIE, 2010). Num contexto de previsão do aumento do custo de extracção do petróleo a par do aumento da concentração de gases com efeito de estufa na atmosfera, a utilização dos biocombustíveis e do bioetanol, em particular, passa a ser uma alternativa à utilização intensiva dos combustíveis fósseis, minimizando-se, simultaneamente, a dependência face a países produtores de petróleo, os quais são por vezes focos de instabilidade política, o que pode por em risco a segurança do seu abastecimento.

O etanol, também conhecido como álcool etílico, é um líquido inflamável e incolor, com um ponto de ebulição de 78,4 °C, ponto de fusão de -114,3 °C e massa volúmica de 0,79 g/cm<sup>3</sup>. Com a sua fórmula molecular de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, o etanol contém, em peso, 52% de carbono, 13% de hidrogénio e 35% de oxigénio. Devido ao seu poder calorífico, o etanol tem uma longa história de utilização para aquecimento e iluminação, e, mais recentemente, tem sido utilizado em motores de combustão interna (Gubpta e Demirbas, 2010).

Devido ao seu elevado índice de octanas, o bioetanol é apropriado para se misturar com gasolina, mas não é adequado a misturar-se com o gasóleo devido ao seu baixo índice de cetano e ao seu maior calor de vaporização, que impede a sua auto-ignição (Gupta e Demirbas, 2010).

Quando comparado com a gasolina, o bioetanol tem um índice de octanas superior, limites de inflamabilidade mais alargados, velocidade de chama mais elevada e maior calor de vaporização. Estas propriedades permitem uma taxa de compressão mais elevada, tempos de combustão mais curtos, resultando em maior eficiência. O bioetanol é um combustível oxigenado, o que reduz a emissão de partículas e de óxidos de azoto, quando queimado. As

suas desvantagens incluem uma densidade energética inferior à da gasolina, a corrosibilidade, dificuldade no arranque devido à sua baixa pressão de vapor, miscibilidade com a água, volatilidade e alguma toxicidade para os ecossistemas (Gupta e Demirbas, 2010).

O bioetanol pode ser utilizado directamente em motores especificamente preparados para o efeito, ou misturado com gasolina para formar uma mistura E10 (10%, em energia, de bioetanol com 90% de gasolina). Pode também ser utilizado em concentrações mais elevadas tais como E85 ou E90. Alguns fabricantes de automóveis produzem veículos flexíveis quanto ao tipo de mistura (*flexifuel*), que podem funcionar com E85, ou qualquer combinação de bioetanol com gasolina (Demirbas e Balat, 2006).

### 2.3 ***Panorama mundial, europeu e nacional***

Mundialmente, a produção de bioetanol tem aumentado, nos últimos dez anos, de forma significativa, tal como se pode observar na Figura 2.1. Desde que iniciou a sua produção, a partir da cana-de-açúcar, e fruto de fortes políticas de apoio a partir do choque petrolífero dos anos 70, o Brasil manteve-se o maior produtor mundial de bioetanol até 2005. Em 2006, os Estados Unidos assumiram essa posição, devido à subsídioção por parte do estado norte-americano à produção de milho para esse fim. A produção, em 2010, destes dois países constituiu 89% da produção mundial de bioetanol e 73% de todos os biocombustíveis produzidos mundialmente (EIA, 2011).

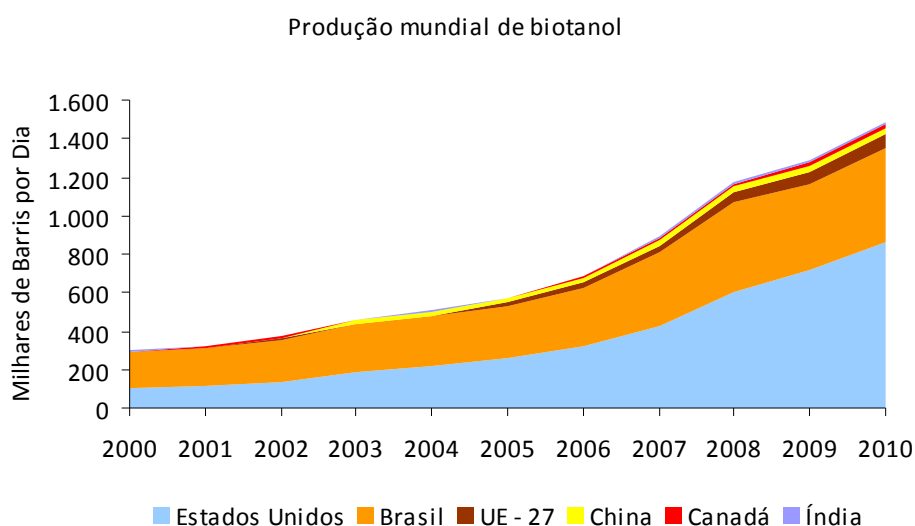


Figura 2.1 – Produção mundial de bioetanol 2000-2010 (EIA, 2011).

A Comissão Europeia, através da Directiva Europeia 2003/30/EC, de 8 de Maio de 2003, acerca da promoção da utilização de biocombustíveis, estabeleceu os princípios para a promoção dos combustíveis alternativos na União Europeia. Em particular, especificou que

cada Estado-Membro deve assegurar que uma quota mínima de biocombustíveis é colocada no mercado, tendo estabelecido valores de referência para as metas, calculadas com base no teor energético.

A quota mínima dever ser de:

- 2% de toda a gasolina e de todo o gasóleo utilizados para efeitos de transporte colocados no mercado, até 31 de Dezembro de 2005;
- 5,75% de toda a gasolina e de todo o gasóleo utilizados para efeitos de transporte colocados no mercado, até 31 de Dezembro de 2010.

A Directiva 2009/28/CE, de 23 de Abril de 2009, actualizou as metas para novos valores, determinando que cada Estado-Membro deve assegurar que a quota de energia proveniente de fontes renováveis, consumida por todos os meios de transporte em 2020, represente, pelo menos, 10% do consumo final de energia nos transportes, em cada Estado-Membro.

Além disso, esta Directiva define pela primeira vez critérios de sustentabilidade para os biocombustíveis, os quais deverão ser cumpridos para que a energia produzida seja contabilizada no cumprimento das metas. Alguns dos critérios impõem que:

- Os biocombustíveis não devem ser produzidos a partir de matérias-primas provenientes de terrenos ricos em biodiversidade (p. ex. floresta primária);
- Os biocombustíveis não devem ser produzidos a partir de matérias-primas provenientes de terrenos com elevado teor de carbono (p. ex. zonas húmidas);

O impacto que estas Directivas tiveram na produção de biocombustíveis na Europa pode ser observado na Figura 2.2, na qual se observa, a partir do ano 2004, um aumento exponencial da sua produção. A produção de bioetanol na União Europeia, em 2010, correspondeu a cerca de 35% da produção total de biocombustíveis (EIA, 2011).

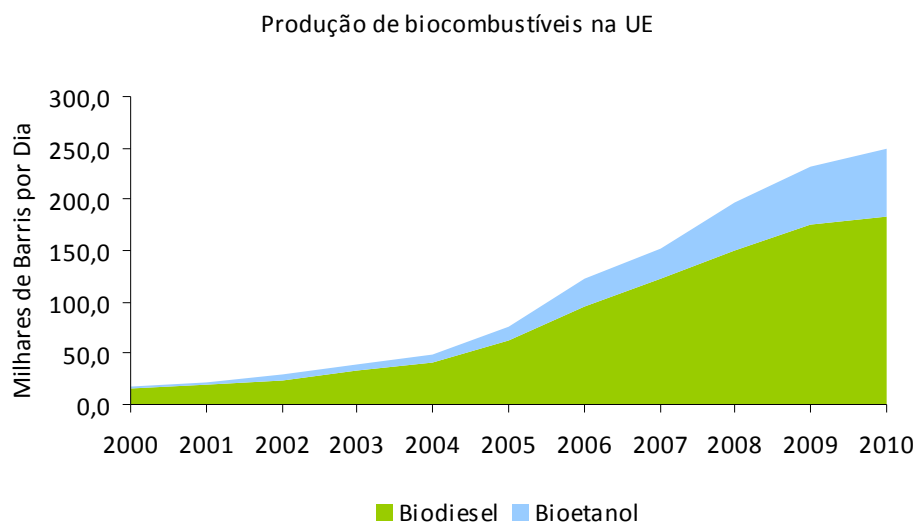


Figura 2.2 – Produção de biocombustíveis na União Europeia 2000-2010 (EIA, 2011).

Em Portugal, o Decreto-Lei 62/2006, de 21 de Março de 2006, transpõe para a legislação nacional a Directiva 2003/30/CE. Este Decreto-Lei visa a colocação no mercado português de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis.

No mesmo ano, a produção de biocombustíveis registou um aumento significativo, sendo a sua totalidade constituída por biodiesel. No ano de 2010 atingiu-se a produção de cerca de 6.000 barris por dia (EIA, 2011). A evolução da produção deste biocombustível pode ser observada na Figura 2.3.

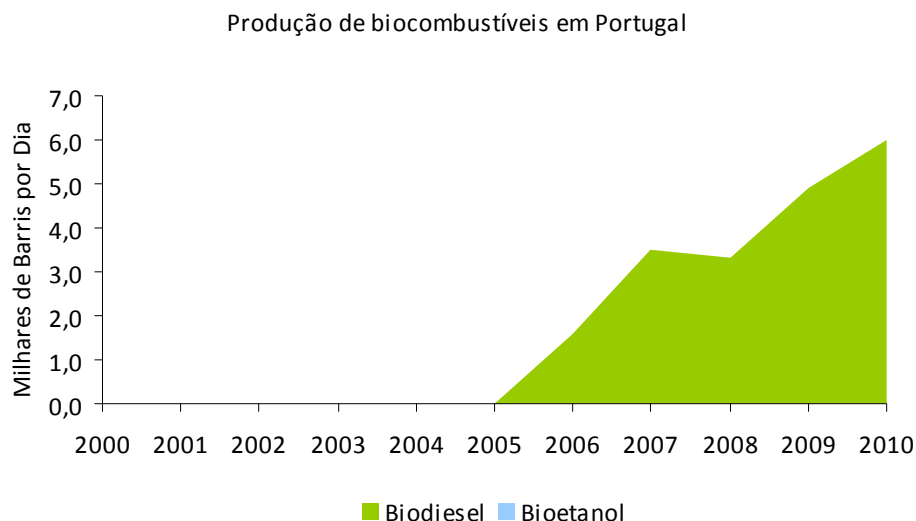


Figura 2.3 – Produção de biocombustíveis em Portugal 2000-2010 (EIA, 2011).

Em resumo, as políticas de apoio à produção de biocombustíveis são um factor-chave para a promoção do seu desenvolvimento.



## **2.4 O bioetanol de 2ª geração**

Tal como referido anteriormente, a produção e utilização de biocombustíveis de 1ª geração tem levantado questões relativas à sua sustentabilidade, devido ao facto de serem produzidos a partir de culturas alimentares, suscitando preocupações quanto à competição que representam perante a utilização humana e animal (Demirbas, 2011).

A tecnologia de produção de biocombustíveis de 1ª geração encontra-se industrialmente demonstrada e na última década a sua produção aumentou drasticamente. Por seu lado, as tecnologias de 2ª geração ainda se encontram na fase de demonstração, não sendo comercialmente operacionais. O principal obstáculo aos biocombustíveis de 2ª geração são os custos de investimento inicial elevados, bem como o elevado custo do produto final, quando comparado com os combustíveis fósseis, ou mesmo com os biocombustíveis de 1ª geração (AIE, 2010).

Embora os investimentos em I&D sejam significativos em alguns países da OCDE, ainda se mantém a incerteza sobre quando os biocombustíveis de 2ª geração se tornarão comercialmente competitivos. No entanto, segundo projecções da Agência Internacional de Energia (AIE, 2008b), entre 2010 e 2015, os custos de produção destes biocombustíveis irão diminuir drasticamente, podendo atingir custos de produção, em 2030, na ordem dos 0,55 USD/leg (leg = litro equivalente de gasolina) e os 0,70 USD/leg, considerando projecções optimistas e pessimistas, respectivamente.

No capítulo seguinte, descrevem-se as propriedades das matérias-primas necessárias à produção de bioetanol de 2ª geração – materiais lenho-celulósicos – bem como todos os processos envolvidos no seu pré-tratamento e processamento.

### 3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LENHO-CELULÓSICOS

#### 3.1 Materiais lenho-celulósicos

A biomassa vegetal é principalmente composta por celulose, hemicelulose e lenhina, bem como por pequenas quantidades de proteínas, pectina, extractivos (p.ex. açúcares, clorofila, ceras) e cinzas. Duas grandes categorias de glúcidos que possuem um valor significativo são a celulose e a hemicelulose. A fracção de lenhina consiste em moléculas não sacarinas. A composição nestes compostos químicos pode variar dependendo do tipo de biomassa (Tabela 3.1). Mesmo dentro de mesmo tipo de biomassa, verificam-se variações da composição devido à idade, etapa de crescimento, e outras condições.

Tabela 3.1 - Composição de algumas matérias lenho-celulósicas, em % do total do peso seco (adaptado de Jørgensen *et al.*, 2007).

Tipo de biomassa	Celulose	Hemiceluloses			Lenhina
	Glicose	Xilose	Arabinose	Manose	
Madeira de folhosas					
Bétula	38,2	18,5	n.d. <sup>a</sup>	1,2	22,8
Salgueiro	43,0	24,9	1,2	3,2	24,2
Madeira de resinosas					
Espruce	43,4	4,9	1,1	12,0	28,1
Pinho	46,4	8,8	2,4	11,7	29,4
Gramíneas					
Palha de trigo	38,2	21,2	2,5	0,3	23,4
Palha de arroz	34,2	24,5	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	11,9
Palha de milho	35,6	18,9	2,9	0,3	12,3

<sup>a</sup> Não Determinado

##### 3.1.1 Celulose

A celulose localiza-se principalmente na parede celular secundária e faz parte da estrutura fibrosa organizada. A celulose é um polímero orgânico, que é constituído unicamente por unidades de D-glicose, mantidas unidas numa cadeia molecular linear. As unidades de D-glicose encontram-se unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (Figura 3.1) (Jørgensen *et al.*, 2007).

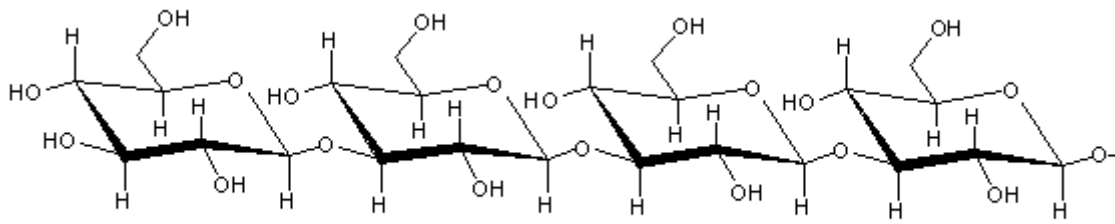


Figura 3.1 – Polímero linear de moléculas de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (UFP, 2011)

O número de unidades de glicose numa única molécula de celulose pode variar de 500 a 5000, dependendo do tipo de biomassa (Gupta e Demirbas, 2010). Numa dada fibra, as moléculas de celulose encontram-se ligadas entre si por forças intermoleculares formadas por pontes de hidrogénio. As cadeias encontram-se organizadas paralelamente, formando uma estrutura super-molecular. Subsequentemente, os conjuntos de cadeias lineares de celulose (no sentido longitudinal) formam a microfibrila (Figura 3.2), a qual está orientada na estrutura celular. As ligações de hidrogénio são fracas, mas a organização de milhares de pontes de hidrogénio confere uma ligação forte ao longo das moléculas de celulose. Este é o motivo pelo qual a celulose não é fácil de quebrar (Gupta e Demirbas, 2010).

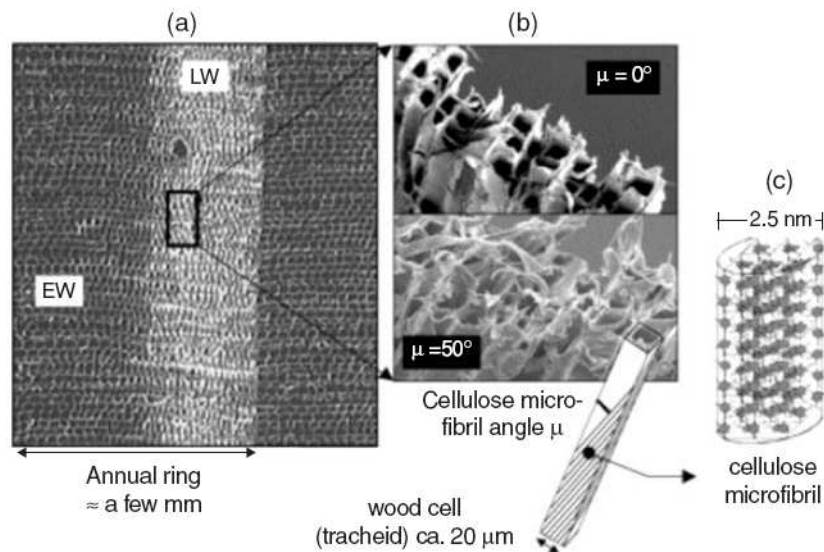


Figura 3.2 – Estrutura hierárquica da madeira de espruce. (a) Secção transversal ao longo do tronco mostrando a madeira recente (EW – “Early Wood”) e a madeira mais antiga (LW – “Late Wood”), com o anel anual (“Annual ring”); (b) Imagem de microfibrilas de madeira de espruce, com dois ângulos diferentes, em microscópio de electrónico. Uma das células da madeira encontra-se desenhada de forma esquemática; (c) Esboço de uma microfibrila de celulose (parte cristalina) de espruce (Gupta e Demirbas, 2010).

A celulose é insolúvel na maior parte dos solventes e apresenta uma baixa acessibilidade à hidrólise ácida e enzimática. No entanto, alguns animais (p. ex. vacas e

térmitas) possuem organismos intestinais que conseguem quebrar a celulose em açúcares, utilizando enzimas  $\beta$ -glicosidases. A biomassa pode também conter uma pequena fração de celulose amorfa, que é mais susceptível à hidrólise enzimática.

### 3.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose, em contraste com a celulose, contém unidades repetidas de vários monossacarídeos. A hemicelulose é um polímero de pentoses (principalmente xilose e arabinose), de hexoses (glicose, manose e galactose) e de ácidos urónicos (glucurónico, galactourónico, etc.) (Gupta e Demirbas, 2010). Outra diferença em relação à celulose é que a hemicelulose possui ramificações, embora a cadeia principal possa ser um homopolímero (constituído pela repetição de uma unidade de açúcar) ou um heteropolímero (mistura de diferentes açúcares) (Figura 3.3).

A função principal das hemiceluloses é a de agir como um material aglomerante que mantém unidas as fibras de celulose (Demirbas, 2008).

As hemiceluloses são muito mais fáceis de hidrolisar em comparação com a celulose, não se agregam, mesmo quando co-cristalizam com a celulose, e são em grande medida solúveis em soluções alcalinas (Kumar *et al.*, 2009).

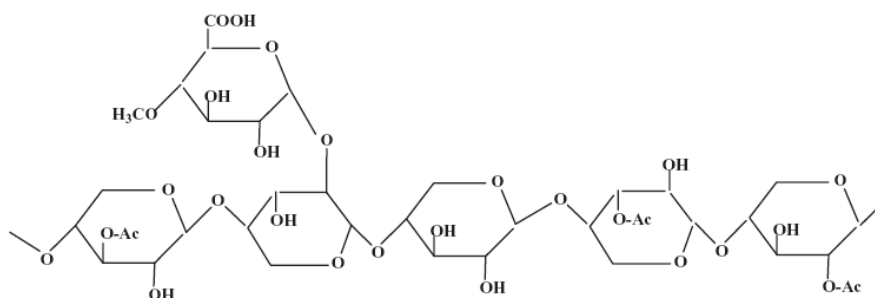


Figura 3.3 – Representação de um segmento de xilano (Gupta e Demirbas, 2010).

As hemiceluloses das madeiras de folhosas são principalmente constituídas por pentosanas (polímero constituído por pentoses), ao passo que as coníferas são constituídas por hexosanas (polímero constituído por hexoses). De entre os açúcares mais importantes presentes na hemicelulose encontra-se a xilose ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ), que constitui a cadeia principal do xilano. A cadeia de xilano consiste em unidades de xilose que se encontram ligadas entre si através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e ramificadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 com ácido 4-O-metilglucurónico (Figura 3.3) (Gupta e Demirbas, 2010).

### 3.1.3 Lenhina

A lenhina é uma macromolécula aromática natural, constituindo uma rede complexa formada pela polimerização de fenilpropano e constitui a maior fracção não-polissacárida dos materiais lenho-celulósicos (Jørgensen *et al.*, 2007).

A lenhina é o componente mais recalcitrante da parede celular vegetal e quanto maior for a fracção de lenhina, maior será a sua resistência à hidrólise enzimática e ácida (Taherzadeh e Karimi, 2008).

A função principal da lenhina nas plantas é a de proporcionar suporte estrutural e providenciar impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos. Consequentemente, a lenhina constitui a principal resistência mecânica e química à utilização da celulose e da hemicelulose para produção de bioetanol (Gupta e Demirbas, 2010).

De um modo geral, as plantas herbáceas, tais como gramíneas, têm conteúdos mais baixos de lenhina, enquanto que as madeiras de folhosas e resinosas possuem um conteúdo mais elevado deste componente (Jørgensen *et al.*, 2007).

## 3.2 Tecnologias de Pré-tratamento

O objectivo de qualquer pré-tratamento dos materiais lenho-celulósicos é o de alterar ou remover impedimentos estruturais ou composicionais à hidrólise, ao quebrar a estrutura da lenhina e desfazer a estrutura cristalina da celulose, de modo a melhorar o rendimento de produção de açúcares fermentáveis a partir da celulose e da hemicelulose (Balat *et al.*, 2008). A Figura 3.4 apresenta as imagens de uma partícula de capim, antes e depois de submetida a pré-tratamento.

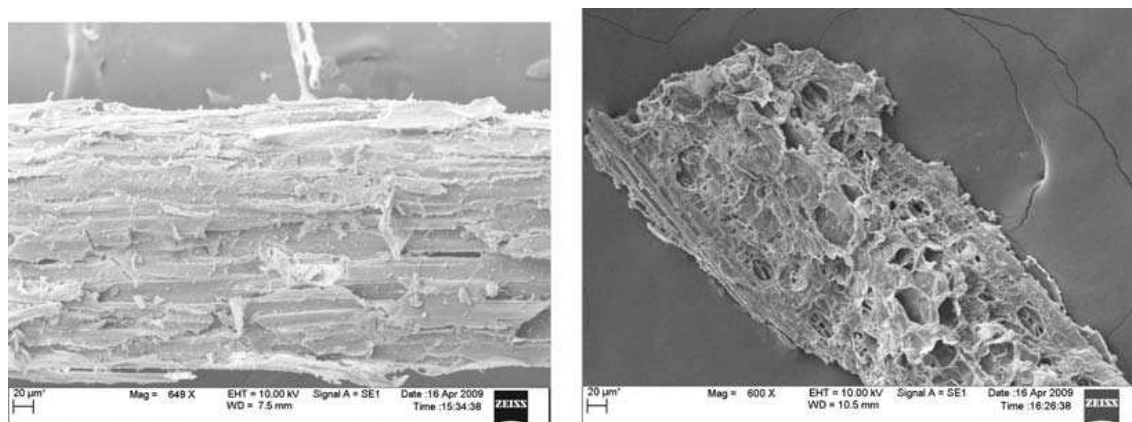


Figura 3.4 – Estrutura de uma partícula de capim (à esquerda) comparada com a sua estrutura após pré-tratamento hidrotérmico com aumento de área de superfície e de volume do poro (Gupta e Demirbas, 2010).

Estudos relativamente recentes têm demonstrado que o pré-tratamento é o passo mais significativo do sucesso da produção de bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos, porque define a extensão e o custo da conversão dos glúcidos da celulose e da hemicelulose em bioetanol (Balat *et al.*, 2008). O maior desafio da produção de bioetanol reside, actualmente, na definição de uma tecnologia de pré-tratamento que apresente uma relação custo-benefício aceitável.

O pré-tratamento deve obedecer aos seguintes requisitos: (1) melhorar a formação de açúcares ou facilitar a sua formação a partir da hidrólise subsequente, (2) evitar a degradação ou perda de glúcidos, (3) evitar a formação de sub-produtos que sejam inibidores dos passos subsequentes de hidrólise e fermentação, e (4) apresentar uma boa relação custo-benefício (Kumar *et al.*, 2009).

Um processo de pré-tratamento universal é difícil de determinar, dada a natureza diversa dos diferentes tipos de biomassa lenho-celulósica. Têm sido sugeridos, durante as últimas décadas, um grande número de tecnologias de pré-tratamento (Alvira *et al.*, 2010). Actualmente, estes podem ser classificados em quatro categorias diferentes: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

### **3.2.1 Pré-tratamentos físicos**

#### ***Fragmentação mecânica***

O objectivo do pré-tratamento mecânico é a redução do tamanho das partículas e da cristalinidade da biomassa lenho-celulósica, de modo a aumentar a área específica e reduzir o grau de polimerização. Tal pode ser efectuado com a combinação de estilhamento, moagem ou trituração, dependendo da dimensão final do tamanho da partícula (10-30 mm depois de redução a estilha e 0,2-2 mm após moagem ou trituração) (Sun e Cheng, 2002). Os requisitos energéticos deste pré-tratamento são relativamente elevados e dependentes do tamanho final pretendido da partícula e das características da biomassa. Tendo em consideração o aumento contínuo do custo da energia, é provável que este processo não seja economicamente viável (Alvira *et al.*, 2010). Outra desvantagem da fragmentação é a sua incapacidade de remover a lenhina que restringe o acesso das enzimas à celulose e inibem as celulasas (Taherzadeh *et al.*, 2008).

### **Extrusão**

O processo de extrusão é um método de pré-tratamento novo e promissor (Alvira *et al.*, 2010).

A extrusão é um processo no qual os materiais são sujeitos a aquecimento, mistura, cisalhamento e compressão simultâneos, resultando em alterações físicas e químicas à medida que estes passam pelo canal do extrusor.

A extrusão aparenta ser um dos processos de pré-tratamento contínuos de biomassa mais viáveis, uma vez que os diversos estudos demonstraram melhorias significativas na recuperação de açúcares de diferentes matérias-primas (Karunanithy e Muthukumarappan, 2011). Sendo um pré-tratamento contínuo, torna-se fácil de adaptar em larga escala. Além disso, não é produzida uma fracção líquida durante a extrusão, não se verificando a necessidade de descarga ou tratamento de efluentes (Karunanithy e Muthukumarappan, 2010).

### **Irradiação**

A irradiação com, por exemplo, raios gama, feixe de electrões e micro-ondas podem melhorar a hidrólise enzimática dos materiais lenho-celulósicos. A combinação da radiação com outros métodos, tais como o tratamento ácido, podem acelerar mais a hidrólise enzimática (Taherzadeh e Karimi, 2008).

A celulose dos materiais lenho-celulósicos pode ser degradada por irradiação a fibras frágeis e a oligossacarídeos de baixo peso molecular e ainda a celobiose. No entanto, os métodos de irradiação são caros e apresentam dificuldades na aplicação industrial (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Os pré-tratamentos físicos, de um modo geral, tornam-se inadequados a processos industriais por serem energeticamente intensivos e exigirem elevados custos de capital (Tomás-Pejó *et al.*, 2008).

## **3.2.2 Pré-tratamentos físico-químicos**

### **Explosão a Vapor**

A explosão a vapor é o pré-tratamento físico-químico mais amplamente utilizado na biomassa lenho-celulósica (Alvira *et al.*, 2010). É um pré-tratamento hidrotérmico no qual a biomassa é sujeita a vapor pressurizado, durante um período de tempo que pode variar entre

alguns segundos até vários minutos, e despressurizado repentinamente até à pressão atmosférica.

Este pré-tratamento combina forças mecânicas e efeitos químicos devido à auto-hidrólise dos grupos acetil presentes na hemicelulose. A auto-hidrólise dá-se quando as altas temperaturas promovem a formação de ácido acético a partir dos grupos acetil. Além disso, a água também pode comportar-se como um ácido a elevadas temperaturas. Os efeitos mecânicos verificam-se devido à redução repentina da pressão, que causa uma explosão resultando na separação das fibras.

Combinada com a hidrólise e solubilização da hemicelulose, a lenhina é redistribuída e, até certo ponto, removida do material. A remoção da hemicelulose expõe a superfície da celulose e aumenta a acessibilidade das enzimas às microfibrilas de celulose.

O processo de explosão a vapor apresenta várias características atractivas, quando comparado com outras tecnologias de pré-tratamento. Estas incluem o potencial de reduzir significativamente os impactes ambientais, baixos custos de capital, maior potencial de eficiência energética, produtos químicos e condições de operação menos perigosas, e completa recuperação de açúcares (Alvira *et al.*, 2010).

As vantagens da explosão a vapor são os baixos requisitos energéticos, quando comparada com a fragmentação mecânica (necessita de mais 70% de energia) e não envolve reciclagem ou custos ambientais (Balat *et al.*, 2008).

Durante o pré-tratamento com explosão a vapor formam-se alguns produtos derivados da degradação que podem ser potenciais inibidores do processo subsequente de fermentação da fracção rica em açúcares (Oliva *et al.*, 2003), sendo esta a principal desvantagem deste processo.

Os compostos tóxicos gerados e as suas quantidades dependem da matéria-prima utilizada e da severidade do pré-tratamento. Os maiores inibidores são os derivados furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos. Os principais derivados furânicos são o furfural e o 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) originados da degradação das pentoses e das hexoses respectivamente (Alvira *et al.*, 2010).

Os ácidos fracos gerados durante a explosão a vapor são maioritariamente o ácido acético, formado a partir dos grupos acetil presentes na fracção hemicelulósica, e o ácido fórmico e levulínico, derivados da degradação posterior do furfural e do HMF. Uma vasta gama de compostos fenólicos é gerada devido à quebra da lenhina, variando muito entre diferentes matérias-primas (Alvira *et al.*, 2010).



### ***Explosão a Vapor com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou SO<sub>2</sub>***

A adição ou impregnação do material lenho-celulósico com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), antes do pré-tratamento, permite diminuir o tempo e a temperatura do mesmo e simultaneamente aumentar a recuperação de açúcares, reduzir a formação de compostos inibidores e melhorar a hidrólise enzimática (Jørgensen *et al.*, 2007).

A adição de um catalisador ácido é um pré-requisito para se atingir um alto rendimento de açúcar. O ácido aumenta a recuperação de açúcares da hemicelulose e melhora a hidrólise da fracção sólida (Balat *et al.*, 2008).

A impregnação com SO<sub>2</sub> gasoso tem a vantagem de poder penetrar rapidamente no material. O H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é um catalisador forte que melhora grandemente a remoção da hemicelulose, mas também promove maior formação de compostos inibitórios. O SO<sub>2</sub>, por outro lado, é geralmente um catalisador menos agressivo, formando menos inibidores, mas também conduzindo a uma menor hidrólise da hemicelulose (Balat *et al.*, 2008).

Os problemas de corrosão são também inferiores quando se utiliza SO<sub>2</sub> em vez de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Jørgensen *et al.* 2007).

Embora o pré-tratamento com vapor, com a adição de um catalisador, seja a tecnologia mais próxima da comercialização, tendo sido testada largamente num grande número de matérias-primas lenho-celulósicas (Jørgensen *et al.* 2007), apresenta como principais desvantagens a necessidade de requisitos mais robustos dos equipamentos, nomeadamente a resistência a ambientes fortemente ácidos (Alvira *et al.*, 2010).

### ***Água Líquida Sobreaquecida***

Cozer os materiais lenho-celulósicos em Água Líquida Sobreaquecida (ALS) é um dos pré-tratamentos hidrotérmicos aplicados há várias décadas, por exemplo na indústria da celulose (Taherzadeh e Karimi, 2008). O objectivo deste pré-tratamento é solubilizar principalmente a hemicelulose, tornar a celulose mais acessível e evitar a formação de compostos inibidores (Alvira *et al.*, 2010).

Este processo utiliza a pressão para manter a água em estado líquido, a temperaturas elevadas, provocando alterações na estrutura da matriz lenho-celulósica (Alvira *et al.*, 2010). O processo ALS envolve normalmente temperaturas entre 200-230 °C, num período até 15 min. Cerca de 40-60% da massa total é dissolvida neste processo, sendo removida 4-22% da celulose, 35-60% da lenhina e a totalidade da hemicelulose. Se o pH for mantido entre 4 e 7, a degradação dos açúcares monossacarídeos e a formação de compostos inibidores podem ser minimizadas (Alvira *et al.*, 2010; Balat, 2011).

As lamas geradas podem ser filtradas, obtendo-se duas fracções: uma sólida, rica em celulose, e uma líquida, rica em açúcares derivados da hemicelulose. Pode ser aplicado um pré-tratamento em duas etapas para otimizar a recuperação de açúcares da hemicelulose e para aumentar os rendimentos da hidrólise enzimática. A lenhina é parcialmente despolimerizada e solubilizada, mas a sua remoção total não é possível utilizando somente água sobreaquecida, devido à re-condensação de componentes solúveis originários da lenhina (Alvira *et al.*, 2010).

As vantagens deste processo são não haver a necessidade da adição de produtos químicos e não serem necessários requisitos de materiais anti-corrosivos para os reactores. Também não se verifica a necessidade de redução do tamanho da biomassa, evitando-se operações de elevada intensidade energética. Comparada com a explosão a vapor, apresenta como principais vantagens a elevada taxa de recuperação de pentoses e a baixa formação de produtos inibidores (Taherzadeh e Karimi, 2008). No entanto, é um processo com elevados requisitos de água e de energia (Alvira *et al.*, 2010).

### ***Explosão de Fibras com Amoníaco***

O tratamento por Explosão de Fibras com Amoníaco ("Ammonia Fiber Explosion – AFEX") é outro tipo de pré-tratamento físico-químico, no qual os materiais lenho-celulósicos são expostos a amoníaco líquido, a elevada temperatura e pressão, durante um determinado período de tempo (Sun e Cheng, 2002).

A pressão é depois libertada, resultando numa rápida expansão do gás de amoníaco com a consequente dilatação e ruptura das fibras de biomassa (Alvira *et al.*, 2010). O conceito de AFEX é similar à explosão a vapor.

Os parâmetros efectivos do processo AFEX são a quantidade de amoníaco, temperatura, quantidade de água, quebra de pressão, tempo e número de tratamentos. Este processo produz apenas um material sólido pré-tratado, enquanto que outros pré-tratamentos, tal como a explosão a vapor, produzem uma lama que pode ser separada numa fracção líquida e outra sólida (Taherzadeh e Karimi, 2008).

O processo AFEX pode modificar ou remover eficientemente a fracção de lenhina dos materiais lenho-celulósicos, enquanto que as fracções de celulose e de hemicelulose permanecem intactas (Taherzadeh e Karimi, 2008).

A digestibilidade da biomassa é aumentada neste pré-tratamento e, assim, a hidrólise enzimática resulta em maiores rendimentos. Ambas as celulasas e hemicelulasas serão necessárias no processo de hidrólise, devido à quantidade considerável de hemicelulose que fica no material pré-tratado (Alvira *et al.*, 2010).

Num processo típico de AFEX, a dosagem de amoníaco líquido é de 1-2 kg  $\text{NH}_3$ /kg de biomassa seca, a uma temperatura de 90 °C e um tempo de residência de 30 min (Sun e Cheng, 2002).

Para reduzir os custos e proteger o ambiente, o amoníaco deve ser reciclado após o pré-tratamento. Num processo de recuperação, o vapor de amoníaco sobreaquecido a uma temperatura de até 200 °C é utilizado para vaporizar e retirar o amoníaco residual da biomassa pré-tratada, sendo o amoníaco vaporizado retirado do sistema por um controlador de pressão para a sua recuperação (Sun e Cheng, 2002).

As principais vantagens do pré-tratamento AFEX são a de não produzir compostos inibitórios para os processos biológicos a jusante, evitando a lavagem com água e o seu consequente tratamento. Também não requer tamanhos de partículas reduzidos para aumentar a sua eficácia (Sun e Cheng, 2002). No entanto, existem algumas desvantagens tais como a necessidade de recuperar o amoníaco no final do processo, ser um pré-tratamento mais adequado para materiais com menores teores de lenhina e não solubilizar hemicelulose significativamente, quando comparado com outras tecnologias (Taherzadeh e Karimi, 2008).

### **3.2.3 Pré-tratamentos químicos**

#### ***Pré-tratamento ácido***

O objectivo principal dos pré-tratamentos ácidos é o de solubilizar a fracção de hemicelulose da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas (Alvira *et al.*, 2010).

O pré-tratamento ácido pode ser operado sob temperaturas elevadas e baixa concentração ácida (pré-tratamento com ácido diluído), ou sob baixa temperatura e concentração ácida elevada (pré-tratamento com ácido concentrado) (Taherzadeh e Karimi, 2008).

A baixa temperatura de operação do pré-tratamento com ácido concentrado (p. ex. 40 °C) é uma vantagem significativa em comparação com o processo com ácido diluído. No entanto, elevadas concentrações de ácido (p. ex. 30-70%) torna-o extremamente corrosivo e perigoso. Por este motivo, este processo requer a construção de equipamentos especializados, com materiais não metálicos ou com ligas dispendiosas. A recuperação do ácido, necessária no processo com ácido concentrado por razões económicas, é um processo exigente em termos energéticos. Por outro lado, o processo de neutralização produz grandes quantidades de gesso. O elevado investimento e custos de manutenção diminuem o interesse comercial deste processo (Taherzadeh e Karimi, 2008).

O pré-tratamento com ácido diluído é provavelmente o método mais aplicado entre os pré-tratamentos químicos. Pode ser utilizado como um pré-tratamento do material lenho-celulósico para a hidrólise enzimática, ou mesmo como um método de hidrólise para obter açúcares fermentáveis (Taherzadeh e Karimi, 2008).

O pré-tratamento com ácido diluído remove e recupera eficientemente a maior parte das hemiceluloses como açúcares dissolvidos, e o rendimento de glicose a partir da hidrólise da celulose aumenta com a remoção da hemicelulose até quase 100% (Kumar *et al.*, 2009).

Atingir elevadas taxas de conversão de xilano em xilose torna-se necessário para atingir economias de processo globais, uma vez que o xilano pode representar até um terço do total de glúcidos em muitos materiais lenho-celulósicos (Sun e Cheng, 2002).

Existem dois tipos principais de pré-tratamento com ácido diluído:

(1) baixa carga de sólidos (peso do substrato / peso da mistura de reacção = 5-10%), temperatura elevada ( $T > 160$  °C), processo contínuo;

(2) alta carga de sólidos (10-40%), temperatura mais baixa ( $T < 160$  °C), processo por lotes (Kumar *et al.*, 2009).

De um modo geral, temperaturas de pré-tratamento mais elevadas e tempos de residência mais curtos resultam em taxas de recuperação de xilose mais elevadas e numa maior digestibilidade enzimática da celulose. Dependendo do substrato e das condições utilizadas, entre 80% a 95% dos açúcares hemicelulósicos podem ser recuperados com o pré-tratamento com ácido diluído (Balat, 2010). No entanto, dependendo da temperatura do processo, alguns compostos derivados da degradação do açúcar, tal como o furfural e o hidroximetilfurfural, e compostos aromáticos derivados da degradação da lenhina, podem ser detectados, afectando o metabolismo dos microrganismos no passo de fermentação. De qualquer modo, este processo produz menos produtos de degradação do que o pré-tratamento com ácido concentrado (Alvira *et al.*, 2010).

A remoção de quase 100% da hemicelulose é possível com este processo. O pré-tratamento não é eficaz em dissolver a lenhina, mas pode quebrá-la e aumentar a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Embora o pré-tratamento com ácido diluído possa melhorar significativamente a hidrólise da celulose, o seu custo é usualmente mais elevado do que os pré-tratamentos físico-químicos, tais como a explosão a vapor ou o AFEX. A neutralização do pH é necessária para os processos a jusante de hidrólise enzimática e de fermentação (Kumar *et al.*, 2009).

### ***Pré-tratamento alcalino***

Algumas bases podem ser utilizadas para o tratamento de materiais lenho-celulósicos. O efeito do pré-tratamento alcalino depende do conteúdo de lenhina dos materiais (Kumar *et al.*, 2009).

O maior efeito do pré-tratamento alcalino é a remoção da lenhina da biomassa, melhorando assim a reactividade dos polissacáridos remanescentes. Adicionalmente, este pré-tratamento remove o grupo acetil e os vários ácidos urónicos na hemicelulose, que baixam a acessibilidade das enzimas à superfície da hemicelulose e da celulose (Mosier *et al.*, 2005).

O pré-tratamento alcalino utiliza temperaturas e pressões mais baixas do que as outras tecnologias de pré-tratamento. Este pode ser efectuado em condições ambiente, ou a temperaturas elevadas, mas os tempos de pré-tratamento são na ordem de horas ou dias, em vez de minutos ou segundos (Balat *et al.*, 2008).

Este processo é caracterizado por causar menor degradação de açúcares do que os tratamentos ácidos e demonstrou ser mais efectivo em resíduos agrícolas do que em materiais lenhosos (Alvira *et al.*, 2010). No entanto, a perda possível de açúcares fermentáveis e a produção de compostos inibidores deve ser tida em consideração para otimizar as condições do pré-tratamento.

O hidróxido de sódio (NaOH), de potássio (KOH), de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) ou de amónio (NH<sub>4</sub>OH) são bases apropriadas para este pré-tratamento. Destes quatro, o NaOH é o que tem sido mais estudado (Balat, 2011). O tratamento da biomassa lenho-celulósica com NaOH diluído causa a sua dilatação, conduzindo a um aumento da área de superfície interna, à diminuição da cristalinidade, à separação das ligações estruturais entre a lenhina e os glúcidos e à quebra da estrutura da lenhina (Balat, 2011).

A cal (Ca(OH)<sub>2</sub>), em comparação com o NaOH e com o KOH, tem menor custo e requisitos de segurança menos significativos, podendo ser recuperada do hidrolisado pela reacção com CO<sub>2</sub>. O carbonato resultante pode ser reconvertido em cal (Balat, 2011).

### ***Pré-tratamento com líquidos iónicos***

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na utilização de Líquidos Iónicos (LI's) como solventes ambientalmente mais benignos (Hayes, 2009).

Os LI's são sais tipicamente compostos por grandes catiões orgânicos e por pequenos aniões inorgânicos, que se encontram em estado líquido a temperaturas relativamente baixas, muitas vezes à temperatura ambiente (Alvira *et al.*, 2010).

As suas propriedades solventes podem ser variadas através do ajustamento dos aniões e os constituintes alquílicos do catião. Tornam-se interessantes por apresentarem estabilidade química e térmica, ausência de inflamabilidade, baixa pressão de vapor e uma tendência para permanecerem no estado líquido numa vasta gama de temperaturas (Hayes, 2009).

Uma vez que não se formam gases tóxicos ou explosivos, os LI's são denominados de solventes "verdes" (Alvira *et al.*, 2010).

Os glúcidos e a lenhina podem ser simultaneamente dissolvidos em LI's com a actividade iónica, por exemplo com o Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIM][Cl]), porque os LI's formam pontes de hidrogénio entre os iões cloreto e os protões do hidróxilo dos açúcares, numa estequiometria de 1:1. Como resultado, a rede intrincada de interacções não-covalentes entre os polímeros de biomassa de celulose, hemicelulose e lenhina é efectivamente quebrada, enquanto a formação de produtos de degradação é minimizada (Alvira *et al.*, 2010).

Uma celulose relativamente pura pode ser precipitada adicionando água, etanol ou acetona, enquanto a lenhina e os outros componentes permanecem dissolvidos. Esta celulose regenerada pode ter um grau de polimerização idêntica à que tinha antes do pré-tratamento com LI's. No entanto, o grau de cristalinidade pode ser manipulada durante a regeneração (Hayes, 2009).

A hidrólise da celulose regenerada é significativamente aumentada e a taxa inicial de hidrólise é aproximadamente uma ordem de grandeza mais elevada do que na celulose não tratada. Nos LI's, a quase totalidade da conversão da fracção de glúcidos em produtos solúveis em água observa-se a 120 °C, que é muito inferior às temperaturas normalmente utilizadas na hidrólise de fase aquosa (Gupta e Demirbas, 2010).

É geralmente aceite que é necessária mais investigação sobre os LI's, uma vez que a maior parte dos dados que demonstram a sua eficácia têm sido obtidos utilizando celulose cristalina. A sua aplicabilidade a uma combinação mais complexa de constituintes presentes na biomassa lenho-celulósica torna-se necessária para melhorar a economia dos LI's, porque o seu custo é elevado e os métodos de recuperação ainda não se encontram totalmente desenvolvidos (Hayes, 2009; Alvira *et al.*, 2010).

### **3.2.4 Pré-tratamentos biológicos**

Diversos pré-tratamentos fúngicos têm sido estudados para melhorar os materiais lenho-celulósicos para alimentação animal e para a produção de papel. Recentemente, esta aproximação tem recebido atenção renovada como um método de pré-tratamento para

melhorar a sacarificação enzimática da biomassa lenho-celulósica nos processos de produção de bioetanol (Alvira *et al.*, 2010).

Muitos microrganismos são capazes de degradar e utilizar a celulose e a hemicelulose como fontes de carbono e de energia. No entanto, um grupo muito mais pequeno de fungos filamentosos evoluiu no sentido de conseguir quebrar a lenhina, o componente mais recalcitrante das paredes das células vegetais. Estes são conhecidos como fungos da podridão branca, os quais possuem a capacidade única de degradar eficientemente a lenhina em CO<sub>2</sub>. Outros fungos, capazes de degradar os compostos lenho-celulósicos, são os fungos da podridão castanha que despolimerizam rapidamente os materiais celulósicos, enquanto que apenas modificam a lenhina (Sánchez, 2009).

De um modo geral, tais processos apresentam vantagens, tais como baixos custos de capital, baixos consumos de energia, não necessitam de produtos químicos, e necessitam de condições de operação moderadas. No entanto, a principal desvantagem dos métodos biológicos é a baixa taxa de hidrólise atingida na maioria dos materiais, quando comparada com outras tecnologias (Balat, 2011).

Existem outros métodos de pré-tratamento que não foram descritos no presente trabalho por se considerar que não representam interesse actual, tendo em consideração diversos factores, tais como os custos elevados associados, o seu estágio de desenvolvimento precoce e a ausência de resultados presentes na actual bibliografia referentes ao tema central deste documento. No entanto, referenciam-se alguns deles:

- Métodos físicos: Pirólise.
- Métodos físico-químicos: Oxidação Húmida, Ultra-sons, Explosão com CO<sub>2</sub>.
- Métodos químicos: Ozonolise, Solventes orgânicos.

Em suma, uma vasta gama de pré-tratamentos são adequados a diversos tipos de biomassa lenho-celulósica, mas deve referir-se que nem sempre é possível transferir os resultados obtidos num pré-tratamento de um determinado tipo de material lenho-celulósico para outro, ou seja, uma tecnologia que é eficiente para uma determinada biomassa, pode não funcionar noutra.

Os métodos de pré-tratamento podem também ser combinados entre si, até que se atinjam valores de açúcares hidrolisados aceitáveis.

Os vários pré-tratamentos aqui referidos, bem como as suas desvantagens e vantagens, são resumidas na Tabela 3.2. A escolha do processo para determinada biomassa depende da sua composição e da quantidade de sub-produtos produzidos. Tais factores afectam significativamente os custos associados aos métodos de pré-tratamento.

Tabela 3.2 – Vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento de biomassa lenho-celulósica.

<i>Processo de pré-tratamento</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Fragmentação mecânica	Reduz a cristalinidade da celulose.	Elevado consumo energético.
Extrusão	Processo adequado a vários tipos de biomassa; Processo contínuo e facilmente adaptável à escala industrial; Não produz efluentes.	Elevado consumo energético; Tecnologia em fase de desenvolvimento.
Irradiação	Pode ser combinado com outros métodos de pré-tratamento.	Processo caro; Difícil aplicação industrial.
Explosão a Vapor	Altera a lenhina e solubiliza a hemicelulose; Custo acessível; Alto rendimento de glicose e hemicelulose.	Origina produtos tóxicos; Degradação parcial da hemicelulose.
ALS	Não necessita de produtos químicos; Elevada taxa de recuperação de pentoses; Baixa produção de substâncias inibidoras.	Processo energeticamente intensivo; Elevados consumos de água.
AFEX	Aumenta a área de superfície acessível; Elevada taxa de recuperação de pentoses; Baixa formação de inibidores.	Não é eficiente para materiais com elevados teores de lenhina; Elevado custo do amoníaco.
Pré-tratamento ácido	Tempos de reacção rápidos; Dissolve a totalidade de hemicelulose.	Requisitos e custos de equipamentos elevados;
Pré-tratamento alcalino	Remove a hemicelulose e a lenhina; Aumenta a área de superfície acessível.	Necessita de maiores tempos de residência;
Líquidos Iónicos	Não produz produtos tóxicos ou inflamáveis; Baixos consumos energéticos.	Tecnologia ainda pouco estudada.
Degradação Biológica	Degrada a lenhina e a hemicelulose; Baixos consumos energéticos.	Baixa taxa de hidrólise.



### 3.3 Hidrólise de Materiais Lenho-celulósicos

Os métodos de pré-tratamento de materiais lenho-celulósicos referem-se fundamentalmente à solubilização e separação de um, ou mais, dos quatro principais componentes da biomassa lenho-celulósica (hemicelulose, celulose, lenhina e extractivos), de modo a tornar mais acessível a biomassa sólida aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores (Demirbas, 2005).

Os polímeros de glúcidos, presentes nos materiais lenho-celulósicos, necessitam de ser convertidos em açúcares simples, antes do processo de fermentação, através de um processo denominado de hidrólise.

A hidrólise (ou sacarificação) quebra as ligações de hidrogénio, e glicosídicas, nas fracções de hemicelulose e de celulose, reduzindo-as aos seus açúcares constituintes: pentoses e hexoses. Estes açúcares podem depois ser fermentados em bioetanol, enquanto que a lenhina resulta num sub-produto do processo (Demirbas, 2005; Taherzadeh e Karimi, 2007), tal como se apresenta na Figura 3.5.

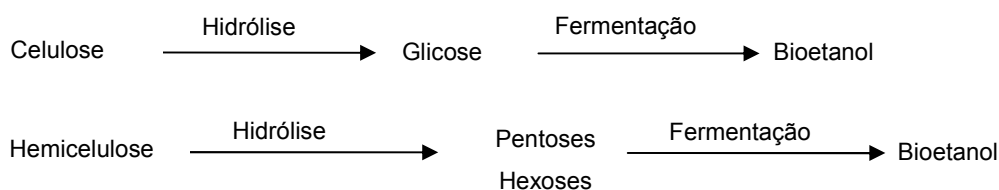


Figura 3.5 – Processos globais de hidrólise e fermentação de celulose e hemicelulose

Podem ser utilizados dois tipos de processos para hidrolisar a biomassa lenho-celulósica. Os métodos mais utilizados podem ser classificados em dois grupos: hidrólise química e hidrólise enzimática (Taherzadeh e Karimi, 2007).

Existem outros métodos de hidrólise, nos quais não são utilizados produtos químicos ou enzimas: por exemplo, irradiação com raios gama ou feixe de electrões, ou irradiação com micro-ondas. No entanto, estes processos não são comercialmente atractivos (Balat, 2011), pelo que não serão discutidos na presente dissertação.

### 3.3.1 Hidrólise química

A hidrólise química envolve a exposição dos materiais lenho-celulósicos a um produto químico, durante um determinado período de tempo e a uma temperatura específica, resultando na formação de monómeros de açúcares provenientes dos polímeros de celulose e de hemicelulose. Na hidrólise química são aplicados principalmente ácidos. O ácido sulfúrico é o ácido mais investigado e utilizado industrialmente, embora outros ácidos, tais como o HCl, também tenham sido utilizados (Taherzadeh e Karimi, 2007).

A hidrólise ácida pode ser dividida em dois grupos: (a) hidrólise com ácido concentrado e (b) hidrólise com ácido diluído (Balat, 2011), as quais são discutidas seguidamente.

#### ***Hidrólise com ácido concentrado***

Este método utiliza, usualmente, ácido sulfúrico concentrado, seguido por uma diluição em água, para dissolver e hidrolisar o substrato em açúcares. O processo promove uma conversão rápida e completa da celulose em glicose, e da hemicelulose em pentoses, com pouca formação de produtos de degradação (Demirbas, 2005).

O processo de hidrólise com ácido concentrado requer um pré-tratamento ácido (diluído ou concentrado) (Balat, 2011) e opera-se em duas fases. Na primeira fase, o resíduo sólido, proveniente do pré-tratamento ácido, é escorrido e seguidamente impregnado com uma concentração de 30 a 40% de ácido sulfúrico, durante 1 a 4 horas (pré-hidrólise da celulose). Na segunda fase, a solução é novamente escorrida, seca e impregnada com uma concentração de ácido de cerca de 70%. Após a reacção num outro reactor durante 1 a 4 horas, a baixas temperaturas, os conteúdos são separados para recuperar os açúcares e o ácido (Demirbas, 2005).

A principal vantagem do processo de hidrólise com ácido concentrado é o seu potencial para uma elevada eficiência de recuperação de açúcares. A utilização de baixas temperaturas e pressões, além de minimizar a degradação dos açúcares, permite também a utilização de materiais de custo relativamente baixo, tais como reactores e tubagem em fibra de vidro (Demirbas, 2005).

A principal desvantagem é a de ser um processo relativamente lento, tendo sido difícil desenvolver sistemas de recuperação do ácido a custo aceitável. Sem recuperação do ácido, torna-se necessária a utilização de grandes quantidades de cal para o neutralizar, originando grandes quantidades de sulfato de cálcio, o que aumenta consequentemente o custo do processo (Demirbas, 2005).

### **Hidrólise com ácido diluído**

A hidrólise com ácido diluído é operada a elevadas temperaturas e pressões, e com um período de reacção que varia entre segundos a minutos, o que facilita o processamento contínuo (Demirbas, 2005).

O processo com ácido diluído envolve uma solução de  $H_2SO_4$  numa concentração de cerca de 1%, num reactor em fluxo contínuo, a elevada temperatura (216 °C). A maior parte dos processos com ácido diluído estão limitados a uma eficiência de recuperação de açúcares de cerca de 50%. A utilização de ácido a elevadas temperaturas e pressões requer que o reactor seja construído com materiais específicos, resistentes a estas condições agressivas de hidrólise, o que o pode tornar dispendioso (Balat, 2011).

A principal vantagem da hidrólise com ácido diluído é o seu curto tempo de reacção, o que facilita o processamento contínuo. Uma vez que os açúcares de 5 carbonos (pentoses) se degradam mais rapidamente do que os açúcares com 6 carbonos (hexoses), uma forma de reduzir a degradação de açúcares é a de operar o processo de hidrólise em duas etapas. A primeira etapa é conduzida em condições menos agressivas para remover as pentoses, enquanto que a segunda etapa é conduzida sob condições mais agressivas para recuperar as hexoses (Demirbas, 2005).

O principal desafio actual dos processos de hidrólise com ácido diluído é o de aumentar as taxas de recuperação de glicose para valores acima dos 70%, num processo industrial economicamente viável, mantendo simultaneamente taxas elevadas de hidrólise de celulose e minimizando a decomposição da glicose. Para um rápido processamento contínuo e de modo a permitir um acesso adequado ao ácido, é necessário também uma redução do tamanho das partículas de biomassa lenho-celulósica (Balat, 2011).

### **3.3.2 Hidrólise Enzimática**

As enzimas são proteínas naturais que catalisam determinadas reacções químicas. De modo a que as enzimas possam funcionar eficientemente, estas devem ter acesso às moléculas a hidrolisar, o que requer o pré-tratamento da biomassa lenho-celulósica, para remover a lenhina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose e, simultaneamente, quebrar a estrutura cristalina da celulose (Demirbas, 2005).

A hidrólise enzimática de materiais lenho-celulósicos é um processo lento, porque a hidrólise da celulose é prejudicada devido a parâmetros estruturais do substrato, tais como o conteúdo de lenhina e hemicelulose, área de superfície e cristalinidade da celulose (Balat *et al.*, 2008).

Os custos dos equipamentos para operar a hidrólise enzimática são inferiores em comparação com a hidrólise química, uma vez que a hidrólise enzimática é normalmente efectuada em condições pouco exigentes (pH de 4,8 e temperatura entre 46 e 51 °C), não apresentando também problemas de corrosão (Balat *et al.*, 2008).

### **Hidrólise da celulose**

A celulose é hidrolisada por enzimas denominadas celulasas. Estas enzimas são produzidas por diversos microrganismos, usualmente por bactérias e fungos. Estes microrganismos podem ser, no que diz respeito à presença de oxigénio no meio, aeróbios ou anaeróbios, e, no que diz respeito à temperatura, mesofílicos ou termofílicos (Balat, 2011).

As bactérias pertencentes aos géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* podem eficientemente produzir celulasas. Os fungos, tais como as espécies *Sclerotium rolfsii* e *P. chrysosporium* e os géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*, são utilizados para produzir celulasas. Estirpes mutantes de *Trichoderma* sp. (*T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*) têm sido há muito tempo consideradas como muito produtivas e destruidoras da cristalinidade da celulose (Balat, 2011).

Uma hidrólise eficiente da celulose requer um determinado número de enzimas. De acordo com o sistema tradicional de classificação, as enzimas celulósicas encontram-se divididas em três classes (Jørgensen *et al.*, 2007): exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH) (nomenclatura IUPAC: EC 3.2.1.91), que se movem ao longo da cadeia de celulose, produzindo nas suas terminações unidades de celobiose (dissacarídeo com duas moléculas de celulose); endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolisam ligações glicosídicas internas  $\beta$ -1,4, aleatoriamente na cadeia de celulose; 1,4- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobioses em glicose. Todas estas enzimas trabalham sinergeticamente para hidrolisar a celulose ao criarem novas localizações acessíveis umas às outras (Jørgensen *et al.*, 2007).

Existem diversos factores que afectam a hidrólise enzimática da celulose, nomeadamente, o tipo de substrato, a actividade das celulasas, as condições de reacção (temperatura, pH, bem como outros parâmetros) e a formação de produtos inibidores. A taxa da hidrólise enzimática da celulose é dependente de várias características estruturais da celulose, tais como: (1) estrutura molecular da celulose, (2) cristalinidade da celulose, (3) área de superfície da fibra de celulose, (4) grau de dilatação da fibra de celulose, (5) grau de polimerização e (6) presença de lenhina e de outros materiais associados (Balat, 2011).

### **Hidrólise da hemicelulose**

A maior parte da investigação tem sido dedicada à hidrólise do xilano, presente nas hemiceluloses, por ser este o polímero com maior potencial de aplicação e também por ser o que se apresenta em maiores quantidades em determinados materiais lenho-celulósicos (Balat, 2011).

Ao contrário da celulose, os xilanos são quimicamente muito complexos e a sua degradação requer múltiplas enzimas. As enzimas que degradam o xilano são produzidas por uma grande variedade de fungos e bactérias, tais como as *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. e *Bacillus* spp. (Balat, 2011).

A hidrólise enzimática do xilano envolve um sistema de multi-enzimas que inclui a endoxilanase, exoxilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronosidase, acetil xilano esterase e ácido ferúlico esterase (Balat, 2011).

A endoxilanase ataca a cadeia principal do xilano, enquanto que a  $\beta$ -xilosidase hidrolisa os xilo-oligossacarídeos em xilose. A  $\alpha$ -arabinofuranosidase e a  $\alpha$ -glucuronosidase removem, da cadeia de xilano, a arabinose e os substituintes ácidos 4-O-metilglucurónicos, respectivamente. As esterases hemicelulolíticas incluem a acetil esterase, que hidrolisa as substituições acetil, e a feruloil esterase, que hidrolisa as ligações ésteres entre as substituições arabinose e o ácido ferúlico. As feruloil esterases também auxiliam à separação da hemicelulose da lenhina, tornam os polissacarídeos libertados mais disponíveis à degradação pelas outras enzimas (Balat, 2011).

Embora o número de enzimas necessárias para a hidrólise do xilano seja muito maior do que para a hidrólise da celulose, a acessibilidade ao substrato é mais fácil uma vez que o xilano não forma estruturas cristalinas compactas (Balat, 2011).

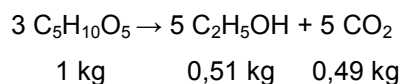
### **3.4 Fermentação**

A fermentação envolve a acção de microrganismos, que utilizam os açúcares como substrato. Durante o processo libertam etanol e outros sub-produtos. Estes microrganismos utilizam tipicamente açúcares com 6 carbonos, sendo o mais comum a glicose. Assim, materiais lenho-celulósicos que contenham elevados níveis de glicose, ou precursores de glicose, são os mais facilmente convertíveis em etanol (Demirbas, 2005).

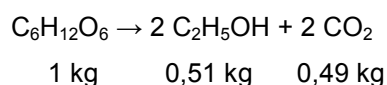
A hidrólise da celulose produz glicose, a qual é facilmente fermentada pelos microrganismos actualmente disponíveis. A hidrólise da hemicelulose produz hexoses e pentoses: manose, galactose, xilose, arabinose e glicose, as quais nem todas são fermentáveis pelas estirpes existentes (Demirbas, 2005).

De acordo com as reacções, a produção máxima teórica é de 0,51 kg de etanol e de 0,49 kg de dióxido de carbono, por kg de açúcar fermentado (Hamelinck *et al.*, 2005), tal como se indica seguidamente:

Fermentação de pentoses em etanol:



Fermentação de hexoses em etanol:



### 3.4.1 Microrganismos envolvidos na fermentação de etanol

Contrariamente à produção de bioetanol baseada na fermentação de sacarose ou amido, a produção de bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos baseia-se na fermentação de uma mistura de açúcares, na presença de compostos inibidores – ácidos orgânicos de baixo peso molecular, derivados de furanos, compostos fenólicos e compostos inorgânicos – libertados e formados durante as etapas de pré-tratamento e de hidrólise das matérias-primas (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). A utilização de materiais lenho-celulósicos como matéria-prima para a produção de bioetanol impõe, assim, requisitos exigentes aos microrganismos potenciais a ser utilizados no processo de fermentação alcoólica (Zaldivar *et al.*, 2001).

Os microrganismos para fermentação de etanol podem ser descritos em termos da gama de parâmetros que condicionam a sua actividade (gama de temperaturas, gama de pH, tolerância ao álcool, produtividade, tolerância osmótica, especificidade enzimática, estabilidade genética e tolerância a inibidores), e de outros requisitos, tais como, compatibilidade com os produtos, processos e equipamentos existentes (Demirbas, 2005). As características necessárias para um microrganismo industrialmente adequado resumem-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Características importantes para o processo de fermentação de bioetanol (Dien *et al.*, 2003)

<i>Característica</i>	<i>Requisitos</i>
Produção de bioetanol	> 90% do valor teórico
Tolerância ao bioetanol	> 40 g l <sup>-1</sup>
Produtividade de bioetanol	> 1 g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Crescimento robusto e requisitos de crescimento simples	Formulação de meios de cultura pouco dispendiosa
Capacidade de crescimento em hidrolisado não diluído	Resistência a inibidores
Condições que minimizem a produção de contaminantes	pH ácido ou temperaturas mais elevadas

Todos os microrganismos apresentam limitações, como por exemplo a incapacidade de processar as pentoses e hexoses, as produções de bioetanol limitadas, ou a co-produção de biomassa celular em prejuízo da produção de bioetanol (Hamelinck *et al.*, 2005). Devido à inexistência de microrganismos naturais que fermentem eficientemente substratos provenientes de materiais lenho-celulósicos, tem sido dado ênfase à “construção” de um organismo eficiente, através da engenharia genética por integração de processos metabólicos de diferentes organismos (Zaldivar *et al.*, 2001).

Os materiais lenho-celulósicos podem conter entre 5 e 20% (ou mais) de pentoses xilose e arabinose, as quais não são fermentáveis pelos microrganismos mais vulgarmente utilizados nos processos industriais. A xilose é a pentose mais abundante nos materiais lenho-celulósicos, pelo que a maior parte da investigação tem sido dedicada ao desenvolvimento de microrganismos que fermentem este açúcar de forma eficiente (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

O microrganismo mais utilizado para a fermentação de bioetanol, em processos industriais, é a *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta uma robustez significativa, sendo adequada à fermentação do hidrolisado de materiais lenho-celulósicos. Esta levedura é capaz de fermentar facilmente as hexoses, mas é incapaz de fermentar a xilose, devido à falta de enzimas que convertem a xilose em xilulose. No entanto, a *S. cerevisiae* consegue fermentar a xilulose (Balat, 2011).

Leveduras que fermentam naturalmente a xilose, tais como a *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e a *Candida parapsilosis*, podem metabolizar a xilose através da acção da xilose-reductase (XR), para converter a xilose em xilitol, e da xilitol-desidrogenase (XDH), para converter o xilitol em xilulose. Assim, a fermentação de bioetanol a partir da xilose pode ser efectuada eficientemente por *S. cerevisiae* recombinante, transportando genes da *P. stipitis* (Balat, 2011).

Bactérias das espécies *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, apresentam características que têm suscitado um interesse crescente devido à sua velocidade de fermentação, a qual pode ser efectuada em minutos, ao invés de horas como se verifica com as leveduras.

A *Z. mobilis* é reconhecida pela sua capacidade em produzir bioetanol com altas taxas de produtividade a partir da glicose, frutose e sacarose, mas é incapaz de fermentar as pentoses, embora tenha sido criada uma estirpe capaz de fermentar a xilose, ao ser-lhe introduzida uma via metabólica a partir da *E. coli* (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). A *Z. mobilis* modificada tem a vantagem de requerer uma quantidade mínima de nutrientes, crescer em pH baixo e a altas temperaturas, e ser considerada como geralmente segura (Balat, 2011).

A construção de estirpes *E. coli*, para produzir bioetanol, foi uma das primeiras aplicações bem sucedidas da engenharia genética metabólica. A *E. coli* tem a capacidade de fermentar uma grande gama de açúcares, não apresenta requisitos complexos de crescimento e já é aplicada industrialmente (p. ex. para a produção de proteínas recombinantes) (Dien *et al.*, 2003). No entanto, as maiores desvantagens em utilizar culturas desta bactéria são uma gama de pH muito estreita (6,0 a 8,0), ser menos robustas (em comparação com as leveduras) e uma percepção pública negativa no que respeita a aspectos de segurança. A falta de dados sobre a potencial utilização da massa celular residual de *E. coli*, como um ingrediente para alimentação animal, constitui também um obstáculo à sua aplicação (Dien *et al.*, 2003).

A *K. oxytoca* é uma bactéria entérica, que cresce em fluxos de processos da indústria celulósica, bem como noutros materiais lenhosos. Este microrganismo é capaz de crescer em valores de pH próximos de 5,0 e a temperaturas de 35 °C. Pode crescer sobre uma grande variedade de açúcares, incluindo hexoses e pentoses, bem como em celobiose e celotriose (Balat, 2011).

As bactérias termofílicas anaeróbias também têm sido examinadas extensivamente, devido ao seu potencial como produtoras de bioetanol. Estas bactérias incluem a *Thermoanaerobacter ethanolicus*, a *Clostridium thermohydrosulfuricum*, a *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Clostridium thermosaccharolyticum* (Balat, 2011). Estas bactérias têm uma vantagem distinta relativamente às leveduras convencionais para a produção de bioetanol, uma vez que possuem a característica de utilizar uma grande variedade de materiais lenho-celulósicos e de suportarem temperaturas extremas. O maior obstáculo à sua utilização para a produção de bioetanol é a sua baixa tolerância a concentrações de etanol (<2% v/v) (Balat, 2011).



### **3.4.2 Estratégias de Hidrólise e de Fermentação**

#### ***Hidrólise e Fermentação Separadas (HFS)***

A hidrólise enzimática separada do processo de fermentação é conhecida como HFS. Na configuração HFS, as fracções líquidas provenientes do processo de hidrólise, entram inicialmente num reactor de fermentação de glicose, sendo depois a mistura destilada para a recuperação do bioetanol. A fracção restante de hemicelulose é fermentada posteriormente num segundo reactor, para que esta possa ser convertida em bioetanol, efectuando-se nova destilação para a sua recuperação. A vantagem do HFS é a possibilidade de operar cada processo nas condições óptimas, i.e., hidrólise enzimática a 46-51 °C e fermentação a 31 °C. A desvantagem deste método é a inibição das enzimas, celulase e  $\beta$ -glucosidade, pela glicose libertada durante o processo de hidrólise, o que obriga a uma menor carga de sólidos e maior cargas de enzimas para atingir produções razoáveis (Balat, 2011).

#### ***Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS)***

Na SFS, a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente no mesmo reactor. Este processo é mais eficiente quando combinado com um pré-tratamento ácido, ou com água líquida sobreaquecida (Balat, 2011). A maior vantagem da SFS é que os açúcares libertados durante a hidrólise enzimática são imediatamente consumidos pelos microrganismos envolvidos na fermentação, o que consequentemente diminui a concentração de produtos inibidores das enzimas (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Esta tecnologia tem sido melhorada de modo a incluir a co-fermentação de substratos com múltiplos açúcares, i.e., a sacarificação simultânea de celulose (em glicose), e de hemicelulose (em xilose), e co-fermentação da glicose e xilose, por micróbios geneticamente modificados presentes no mesmo meio.

#### ***Conversão Microbiana Directa (CMD)***

A conversão microbiana directa (CMD) combina a produção de celulasas, a hidrólise da celulose e a fermentação da glicose numa única etapa. Este processo é atractivo porque reduz o número de reactores, simplifica a sua operação e reduz o custo com produtos químicos. A aplicação desta estratégia evita os custos operacionais necessários para a produção (ou compra) de enzimas, desvio reduzido do substrato para a produção de enzimas e sistemas compatíveis de enzimas e fermentação. As desvantagens são as baixas produções de bioetanol, causadas pela formação de sub-produtos (acetato e lactato), baixa tolerância dos microrganismos ao bioetanol (3,5% w/v), e crescimento microbiano limitado no hidrolisado (Balat, 2011).

## 4 SORGO SACARINO

### 4.1 Generalidades

O sorgo é, mundialmente, a quinta cultura cerealífera mais importante, a seguir ao trigo, arroz, milho e cevada, sendo cultivada em vastas áreas geográficas da América, África, Ásia e Pacífico (Bantillan *et al.*, 2004).

A maioria das variedades cultivadas de sorgo pode ser rastreada à sua origem em África, onde crescem em terrenos da savana (Bassam, 2010), onde foi pela primeira vez domesticada, entre a Etiópia ocidental e o Chade oriental, há 5000-7000 anos atrás (Bantillan *et al.*, 2004).

Sujeito à selecção (natural e humana) e à introgressão com espécies selvagens e daninhas, o sorgo primitivo conduziu à evolução de raças cultivadas. Do seu local de origem, o sorgo propagou-se – principalmente através de mercadores – a outras regiões: Índia, China e Sudeste Asiático, através do Médio Oriente, e para a América, através da África ocidental, setentrional e meridional. Encontra-se presentemente distribuído entre o nível do mar e os 2200 m de altitude, e entre os 50° N na Rússia e 40° S na Argentina (Bantillan *et al.*, 2004). A distribuição mundial da quantidade de área cultivada, por país, pode ser observada na Figura 4.1.

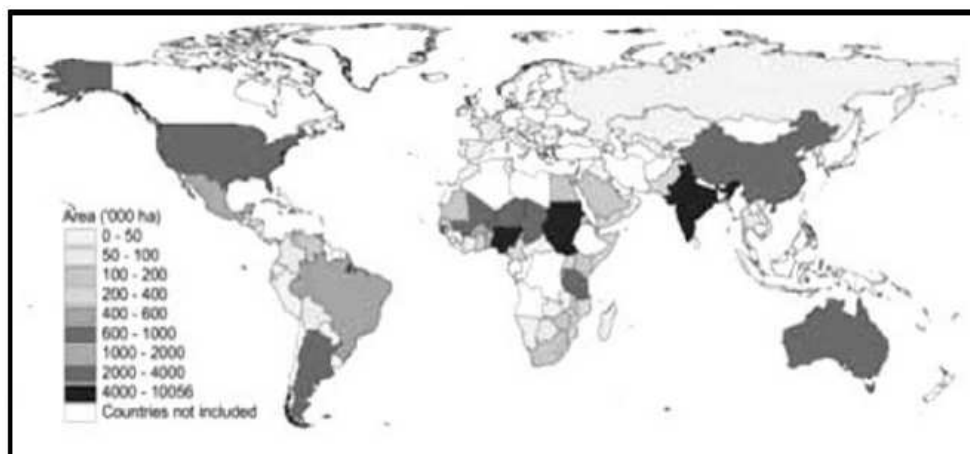


Figura 4.1 – Distribuição da área de cultivo de sorgo em 1999-2001 (Bantillan *et al.*, 2004).

O nome “Sorgo” tem origem na palavra homónima italiana, que por sua vez deriva da palavra latina “Syricum (granum)” que significa “grão da Síria” (Bassam, 2010), e é aplicado a uma gama alargada de genótipos, a maior parte deles a partir das espécies do *Sorghum bicolor* (L.) Moench, pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*) (CETA, 2011).

Dependendo da variedade, o *S. bicolor* é cultivado para o aproveitamento do seu grão (sorgo granífero), para o aproveitamento da sua forragem (sorgo forrageiro), ou para o aproveitamento do seu caule rico em açúcares (sorgo sacarino) (Saballos, 2008). A Figura 4.2 apresenta fotografias das três variedades.



Figura 4.2 – Variedades principais de *S. bicolor* cultivadas. Da esquerda para a direita: Sorgo granífero, sorgo forrageiro e sorgo sacarino (a barra de escala branca representa 10 cm) (Saballos, 2008).

Todos estes sorgos partilham, até certa medida, algumas características fisiológicas, tais como, a elevada taxa fotossintética, ou a sensibilidade ao fotoperíodo e à temperatura, e também algumas características morfológicas. No entanto, o sorgo sacarino destaca-se por uma característica fisiológica: a sua elevada capacidade em acumular açúcares (glúcidos não-estruturais) no caule (CETA, 2011).

## **4.2 Características botânicas**

### **4.2.1 Sistemática**

O *S. bicolor* classifica-se do seguinte modo:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Cyperales

Família: *Poaceae*

Género: *Sorghum* Moench

Espécie: *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Subespécie: *Sorghum bicolor* subsp. Bicolor

#### 4.2.2 Morfologia

##### **Caule**

Morfológicamente, o sorgo sacarino é normalmente erecto, com um único caule. Os caules são similares aos do milho, apresentando sulcos, e são quase ovais (Bassam, 2010). São normalmente sólidos, como os da cana-de-açúcar. Esta característica constitui uma excepção à família das gramíneas. Os caules são formados por um número variável de nós. A sua altura varia entre os 0,5 e 5 m, e a largura, na base, entre os 1,5 e 5 cm de diâmetro (CETA, 2011).

No que diz respeito à estrutura na secção transversal, o caule consiste de uma coroa externa com numerosos feixes vasculares, densamente arranjados. Dentro desta coroa encontra-se uma medula suave, dominada por parênquima, onde aparecem alguns feixes dispersos (Figura 4.3). A maior parte do açúcar, principalmente sacarose, encontra-se acumulada nesta medula (CETA, 2011).



Figura 4.3 – Secção transversal do caule de Sorgo sacarino. (CETA, 2011).

### ***Folhas***

O sorgo sacarino normalmente desenvolve entre 7 a 24 folhas opostas e entrecruzadas ao longo do caule, dependendo da variedade, da latitude e do grau final de desenvolvimento do caule. Normalmente existe uma folha por nó.

As folhas são de cor verde-clara, com nervuras paralelas, e uma longa bainha que envolve o caule. A lâmina foliar é plana e o seu comprimento pode variar entre os 30 e 135 cm. Os estomas podem ser encontrados em ambos os lados da folha (CETA, 2011).

### ***Inflorescência***

As inflorescências encontram-se agrupadas numa panícula (Figura 4.4). O seu comprimento é variável e, quando a inflorescência se encontra bem desenvolvida, pode chegar aos 60 cm (incluindo o pedúnculo) (CETAS, 2011).



Figura 4.4 – Panícula de Sorgo sacarino (Bassam, 2010).

### ***Sistema radicular***

O sorgo sacarino possui um sistema radicular fibroso que se ramifica profusamente. Sob condições favoráveis, os nós acima do solo podem produzir raízes adventícias fortes, que ajudam a ancorar a planta (Bassam, 2010).

O sistema radicular é adventício, com raízes fibrosas e ramificadas, podendo estender-se até 1,5 m (CETA, 2011).

### **4.3 Características biológicas**

O ciclo de desenvolvimento dura pelo menos quatro meses, de Maio a Setembro, dependendo da localização e da variedade. A fase de taxa máxima de crescimento (fase de alongamento) tem de ser coincidente com o período de máxima radiação solar (CETA, 2011).

É semeado na Primavera e geralmente emerge em 7-10 dias. A duração entre a emergência e o perfilhamento é de cerca de 30-40 dias, e da emergência à fase de alongamento é de 47-55 dias. A fase de alongamento depende da variedade e é de 30-90 dias. A floração normalmente ocorre 5-7 dias após a emergência da panícula. A fase de maturação é também muito variável, dependendo da variedade, mas o período comum é de 30 dias (CETA, 2011).

A máxima acumulação de açúcares ocorre após a emergência da panícula, especialmente após a floração. Em regiões onde a temperatura em Setembro é baixa, o desenvolvimento do sorgo é prematuramente interrompido, e a acumulação de açúcares cessa. Os açúcares acumulados nos caules são a glicose, frutose, e principalmente sacarose. Quanto mais maduro for o sorgo, maior o conteúdo de sacarose, e menor o conteúdo de glicose e de frutose (CETA, 2011). Em condições favoráveis para a cultura, o conteúdo de açúcar no caule pode atingir 44% (bs), constituindo a sacarose aproximadamente 30% (Fernandez e Curt, 2005).

O sorgo sacarino possui elevada resistência ao “stress” hídrico, quando comparado com outras culturas tropicais. É resistente a alagamentos e apresenta boa adaptabilidade a solos salinos e alcalinos. Esta grande adaptabilidade permite que o sorgo sacarino seja cultivado onde outras culturas não o podem ser (CETA, 2011). Um dos factores importantes que afectam a sua resistência a períodos de seca é a eficiência do grande sistema radicular fibroso, principalmente raízes secundárias, que se podem estender a uma distância de até 1 m, lateralmente, e a uma profundidade de 1,9 m. O sistema radicular, quando comparado com o do milho, é de cerca de duas vezes mais activo (Bassam, 2010).

Para além da sua capacidade em absorver a água mais eficientemente do que muitas outras culturas, possui uma melhor capacidade para regular a perda de água para a atmosfera, porque reduz a sua taxa de evapotranspiração em maior medida, quando comparadas com outras culturas, em condições semelhantes (Bassam, 2010).

Os sorgos também possuem uma epiderme relativamente cerosa e impermeável que retarda a perda de água dos caules e das folhas. As lâminas foliares estão cobertas com um revestimento ceroso que reduz as perdas de água (Bassam, 2010).

## **4.4 Requisitos agronômicos**

### **4.4.1 Temperatura**

O sorgo sacarino adapta-se bem às regiões quentes do sul da Europa, e moderadamente bem a várias regiões do centro da Europa, com climas moderados. Por ter origem em regiões quentes de África, o sorgo sacarino é uma planta sensível ao frio. Por esse motivo, a sua adaptação a climas frios do norte é pobre (Bassam, 2010).

As temperaturas mínimas são de 7-10 °C para a germinação, e de 15 °C para o crescimento. A temperatura ótima para o crescimento é 27-30 °C (Fernandez e Curt, 2005).

### **4.4.2 Solos**

O sorgo sacarino pode ser cultivado numa grande variedade de solos e de climas (tropical, subtropical e temperado). Embora as melhores produções sejam obtidas em solos férteis, profundos e bem drenados, pode igualmente ser cultivado em solos com piores características: pouco profundos e com pouco conteúdo de matéria orgânica. A gama de pH dos solos, onde o sorgo sacarino consegue crescer, também é muito alargada (entre 5,0 e 8,5) (CETA, 2011).

A temperatura ótima do solo (a 5 cm de profundidade), para a germinação, deverá ser igual, ou superior, a 21 °C. Em climas temperados, a baixa temperatura do solo, na Primavera, representa um sério constrangimento à produção do sorgo, uma vez que reduz a percentagem de germinação e aumenta a incidência de doenças fúngicas das sementes. Em solos com baixo pH, elevados níveis de alumínio podem ser um problema (Saballos, 2008).

### **4.4.3 Fertilizantes**

O sorgo é considerado muito eficiente na utilização dos nutrientes do solo, devido ao seu grande sistema radicular. Em solos pobres, o sorgo responde bem aos fertilizantes, mas em solos de fertilidade média a alta, tende a apresentar um menor grau de resposta aos fertilizantes. A quantidade específica de nutrientes necessária irá depender das características do solo mas, regra geral, a aplicação de fertilizante recomendada para o milho forrageiro será mais do que suficiente para o sorgo (Saballos, 2008).

A dose de fertilização depende da fertilidade do solo e da produtividade desejada. Em climas Mediterrânicos, onde a fertilidade dos solos varia de baixa a moderada, as

necessidades de fertilização são as seguintes: 100-150 kg N, 60-100 kg  $P_2O_5$  e 60-100 kg  $K_2O$ , por hectare. É recomendável que a aplicação de azoto seja efectuada em duas etapas: antes da sementeira e 20-30 dias após a emergência (CETA, 2011).

#### **4.4.4 Sementeira**

Em climas Mediterrânicos, a sementeira deve ser efectuada no início de Maio, de modo a que o sorgo consiga terminar o seu ciclo. A sementeira é normalmente efectuada em linhas afastadas entre si em 0,75 m, com um espaçamento de 0,10-0,15 m ao longo da linha. A profundidade deve ser  $\geq 5$  cm. A dose da sementeira depende da variedade e da capacidade de germinação das sementes. Após a sementeira é essencial manter boas condições de humidade do solo para assegurar a emergência (CETA, 2011).

A selecção da variedade é extremamente importante para obter boas produções. As variedades de ciclo longo são normalmente mais produtivas do que as variedades de ciclo curto. No entanto, em algumas localizações, as variedades de ciclo longo não são recomendáveis porque as temperaturas deverão ser quentes durante todo o ciclo. Em climas Mediterrânicos, esta condição impõe que a temperatura seja quente, ou amena, durante o mês de Setembro (CETA, 2011).

*Variedades de ciclo curto:* o comprimento do ciclo deste tipo de variedade é entre 70 a 90 dias, da emergência à floração, em climas mediterrânicos.

*Variedades de ciclo longo:* podem precisar de cerca de 110 dias da emergência à floração.

#### **4.4.5 Irrigação**

O sorgo sacarino pode crescer em condições de algum “stress hídrico”, mas a produção é afectada (CETA, 2011).

Na Grécia central, as eficiências na utilização de água, dependendo das taxas de irrigação ao longo do período de crescimento, com o método de rega gota-a-gota, variaram entre os 206 l/kg de matéria seca, produzida sob condições altamente irrigadas (458 mm), e os 181 l/kg de matéria seca, produzida quando a irrigação foi restringida a apenas 157 mm (Bassam, 2010).



#### 4.5 Operações de colheita e processamento

A colheita deve ser efectuada quando a acumulação de açúcar atinge o seu pico. A época óptima de colheita corresponde normalmente à fase de desenvolvimento da panícula, uma vez que a máxima produção de açúcar ocorre após a floração. A data depende do local e da variedade utilizada (CETA, 2011).

A colheita do sorgo sacarino tem como finalidade a recolha de todos os açúcares que estão concentrados nos caules. Assim, o método de colheita é efectuado cortando o caule pela base (CETA, 2011).

Os caules são recolhidos por uma máquina de ceifa utilizada para cana. As panículas são removidas e os fardos são transportados para a fábrica onde são moídos para se proceder à extracção do suco. As fábricas desenhadas para a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, podem utilizar o sorgo sacarino como matéria-prima (Saballos, 2008).

#### 4.6 Produtividade da biomassa

As produções de biomassa do sorgo sacarino estão estritamente relacionadas com as condições climáticas que se verificam durante o ciclo de crescimento da planta. Se for cultivado sem limitações de água e em condições climáticas Mediterrânicas, a produção de biomassa situa-se entre as 25 e 35 t (ms)/ha. A proporção de caule situa-se numa gama entre os 75% e 85% (bs) (Fernandez e Curt, 2005).

A Tabela 4.1 mostra os resultados de produtividade de sorgo sacarino, obtidos em várias localizações de Espanha. É notável o efeito dos parâmetros climáticos, característicos das várias latitudes.

Tabela 4.1 – Produção de sorgo sacarino em várias localidades de Espanha (adaptado de Fernandez e Curt, 2005).

Localização	Latitude	Produção de biomassa aérea (t/ha)		% de caule (bs)	Quantidade de açúcares (t/ha)
		Peso fresco	Peso seco		
Soria	41° 35' N	80,5	19,1	75,8	5,8
Madrid	40° 37' N	73,4	17,6	76,1	5,6
Badajoz	38° 51' N	100,5	27,5	77,4	9,6
Málaga	36° 40' N	101,3	30,3	82,4	10,0

Em Portugal, na península de Setúbal (latitude 38° 40' N), foram efectuados ensaios de produtividade de três subespécies de sorgo, de entre as quais o sorgo sacarino. Comparando diferentes datas de sementeira, Fernando *et al.* (2007) obtiveram diferentes valores de

produtividade de biomassa aérea, tendo atingido aproximadamente 40 t/ha de matéria seca. A Figura 4.5 ilustra os diferentes resultados obtidos.

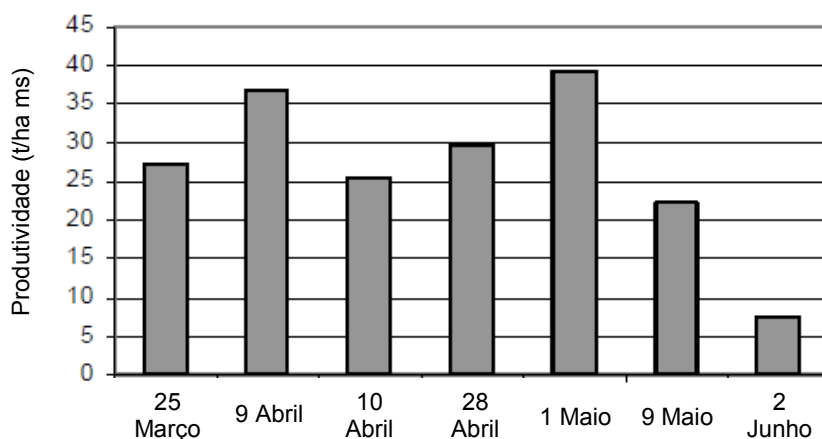


Figura 4.5 – Produtividades de sorgo em função da data de sementeira (Fernando *et al.*, 2007).

#### **4.7 Interesse como cultura energética**

Durante os anos 90 do século XX, o seu cultivo foi considerado para efeitos de produção de energia, devido ao seu elevado conteúdo em açúcar, por se tratar de uma matéria-prima para a produção de bioetanol. Diversos projectos de I&D foram então desenvolvidos na Europa, tendo os resultados mostrado que o sorgo sacarino é uma cultura energética potencial, para os terrenos irrigados da região Mediterrânica (Fernandez e Curt, 2005).

A Tabela 4.2 compara parâmetros de cultivo de culturas sacarinas, entre as quais se encontra o sorgo sacarino.

Tabela 4.2 – Comparação de parâmetros de cultivo de diferentes culturas sacarinas (Almodares e Hadi, 2009).

<i>Parâmetro da cultura</i>	<i>Cana-de-açúcar</i>	<i>Beterraba sacarina</i>	<i>Sorgo sacarino</i>
<i>Duração da cultura</i>	Cerca de 7 meses	Cerca de 5-6 meses	Cerca de 4 meses
<i>Estação de crescimento</i>	Uma estação	Uma estação	Uma estação em regiões temperadas, duas ou três em regiões tropicais
<i>Requisitos do solo</i>	Solos drenados	Solos arenosos; tolerância a alcalinos	Solos drenados
<i>Gestão da água</i>	36000 m <sup>3</sup> /ha	18000 m <sup>3</sup> /ha	12000 m <sup>3</sup> /ha
<i>Gestão da cultura</i>	Requer boa gestão	Requer grandes quantidades de fertilizante; requer gestão moderada	Requer pouco fertilizante; gestão fácil
<i>Produção por ha</i>	70-80 t	30-40 t	54-69 t
<i>Conteúdo de açúcar com base no peso</i>	10-12%	15-18%	7-12%
<i>Produção de açúcar por ha</i>	7-8 t	5-6 t	6-8 t
<i>Produção de bioetanol a partir do suco</i>	3000-5000 l/ha	5000-6000 l/ha	3000 l/ha
<i>Colheita</i>	Mecanizada	Muito simples; normalmente manual	Muito simples; pode ser manual ou mecanizada

Muitos factores, desde a produção de biomassa à composição da mesma, podem influenciar a relação custo-benefício da transformação do sorgo em energia utilizável. No entanto, o sorgo sacarino é uma cultura a partir da qual se podem obter três fontes de açúcares para a fermentação alcoólica, razão pela qual se torna muito interessante como matéria-prima.

A Figura 4.6 sumariza a produção e o processamento da biomassa de sorgo sacarino, que pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de bioetanol, quer seja a partir dos seus grãos, ricos em amido, ou do seu suco, rico em açúcares simples, ou ainda do bagaço resultante após a extracção do suco, rico em materiais lenho-celulósicos.

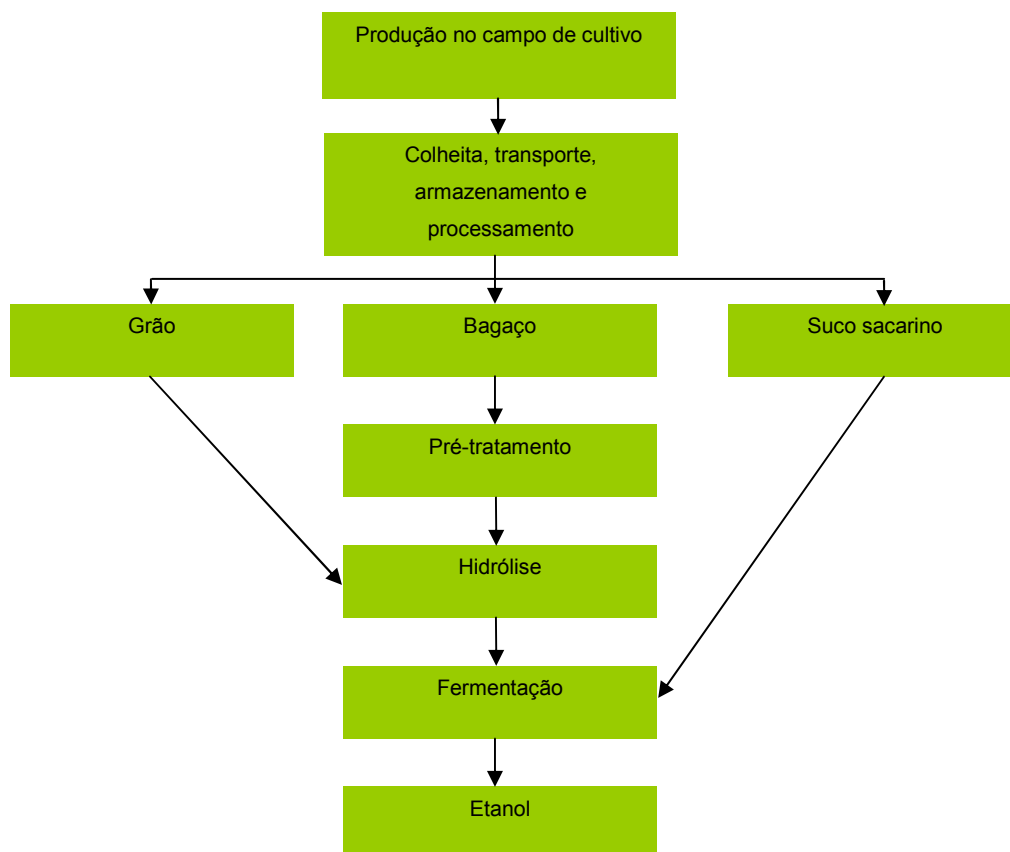


Figura 4.6 – Esquema de valorização energética do sorgo sacarino para a produção de bioetanol (adaptado de Saballos, 2008).

O bagaço de sorgo sacarino, tal como outros materiais lenho-celulósicos, contém uma quantidade considerável de polímeros de glúcidos e de lenhina. Os glúcidos podem ser hidrolisados a açúcares fermentáveis, por ácidos ou enzimas, e posteriormente fermentados em bioetanol, aplicando os processos descritos no capítulo anterior.

A produção de bioetanol é sugerida como uma utilização promissora do bagaço de sorgo sacarino, devido à elevada produção por hectare e aos custos de produção mais baixos, quando comparados com outras culturas (Goshadrou *et al.*, 2011).

Sendo o objectivo desta dissertação o de apresentar os desenvolvimentos registados na utilização do bagaço de sorgo sacarino, como matéria-prima potencial para a produção de bioetanol, não pode deixar de ser efectuada a comparação da composição desta matéria lenho-celulósica com outras espécies vegetais. Assim, apresenta-se na Tabela 4.3 a composição de vários materiais lenho-celulósicos, nas suas fracções mais representativas: lenhina, celulose e xilano.

Tabela 4.3 – Composição de alguns materiais lenho-celulósicos (%) (adaptado de Carroll e Somerville, 2009).

<b>Cultivar</b>	<b>Lenhina</b>	<b>Celulose</b>	<b>Xilano</b>	<b>Extractivos</b>	<b>Cinzas</b>
Bagaço de cana-de-açúcar	23,09	39,01	22,05	3,78	3,66
Palha de milho	18,59	37,69	21,61	5,61	10,06
Palha de trigo	16,85	32,64	19,22	12,95	10,22
Eucaplito	26,91	48,07	10,42	4,15	1,22
Sorgo sacarino	16,09	34,01	14,14	22,03	5,04

Analisando a Tabela 4.3 pode concluir-se que a composição dos materiais lenho-celulósicos difere entre cada espécie vegetal, o que tem implicações na determinação dos parâmetros dos processos envolvidos na produção de bioetanol, a partir destas matérias-primas.

No capítulo seguinte reúne-se um conjunto de resultados, identificados na bibliografia, que foram determinados por diversos autores, cujo objecto de estudo comum a todos eles foi o da utilização do bagaço de sorgo sacarino como matéria-prima para a potencial produção de bioetanol.

## **5 VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LENHO-CELULÓSICOS DO SORGO SACARINO PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos por diversos autores, em estudos de valorização dos materiais lenho-celulósicos provenientes do sorgo sacarino, como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Da pesquisa bibliográfica realizada, foi constituído um universo de catorze publicações, das quais a mais antiga foi publicada em 2004, tendo as mais recentes sido publicadas em 2011.

O conjunto de resultados apresentado constitui uma parte considerável da informação actualmente disponível sobre o aproveitamento dos materiais lenho-celulósicos desta cultura energética, o qual poderá ser considerado para futuras linhas de investigação científica, considerando o estado actual da tecnologia de produção de bioetanol de 2ª geração e as perspectivas promissoras que a cultura de sorgo sacarino apresenta.

Pretende-se dar a conhecer os desenvolvimentos mais significativos, obtidos em cada uma das fases de produção de bioetanol, isto é, nos processos de pré-tratamento, de hidrólise e de fermentação.

Factores económicos, sociais e ambientais não são incluídos no âmbito desta dissertação, pelo que unicamente se irão detalhar os resultados que se encontram directamente relacionados com a optimização da produção de bioetanol, tais como, eficiências na alteração da matriz lenho-celulósica, taxas de conversão de glúcidos em açúcares simples e volumes de produção de bioetanol.

### **5.1 *Efeitos dos pré-tratamentos***

Tal como referido anteriormente (Capítulo 3), o objectivo do pré-tratamento é o de alterar, ou remover, os impedimentos à hidrólise dos materiais lenho-celulósicos. Assim, o mecanismo principal de avaliação da sua eficácia é o de quantificar o grau de produção de açúcares simples após a hidrólise.

No entanto, de modo a avaliar o efeito que o pré-tratamento teve na composição da estrutura lenho-celulósica, alguns estudos quantificam as variações dos conteúdos de celulose, hemicelulose e de lenhina após este processo, pelo que esses resultados serão também apresentados. De modo a uniformizar resultados, indicam-se sempre as variações observadas em termos percentuais.

No subcapítulo 5.2 serão apresentados os valores de conversão de glúcidos em açúcares simples, após a hidrólise dos materiais lenho-celulósicos, previamente pré-tratados.

Refira-se que os materiais lenho-celulósicos, em todos os trabalhos, foram previamente submetidos a trituração mecânica, antes de terem sido submetidos aos pré-tratamentos.

### **5.1.1 Explosão a vapor**

Neste subcapítulo detalham-se os resultados mais relevantes obtidos com o pré-tratamento com explosão a vapor.

Ballesteros *et al.* (2004) avaliou os efeitos deste pré-tratamento sobre vários materiais lenho-celulósicos, entre os quais se encontrava o bagaço de sorgo sacarino. O processo foi efectuado por lotes, com um reactor aquecido directamente com vapor saturado a 210 °C, durante 2 min. Após a explosão, o material foi recuperado num ciclone e o material húmido foi arrefecido e posteriormente filtrado para a recuperação de sólidos.

Os resultados mostraram que cerca de 40% do bagaço foi dissolvido com o pré-tratamento. Cerca de 95% da fracção de hemicelulose foi solubilizada, tendo a sua fracção variado de 25,3% para 1,9%, enquanto que 26% da celulose foi solubilizada, tendo a sua fracção aumentado de 44,6% para 52,9%.

Sipos *et al.* (2009) efectuaram o pré-tratamento com adição de SO<sub>2</sub>. Antes de se iniciar o pré-tratamento, o bagaço foi inicialmente triturado, seco, e tratado com vapor à pressão atmosférica, durante uma hora, para se atingir uma humidade de 50%. O material foi depois impregnado com uma solução de 2% de SO<sub>2</sub> e fechado em sacos de plástico, durante 30 min. Efectuou-se o pré-tratamento em reactor, e a temperatura foi mantida nas condições desejadas com injeção de vapor saturado. Foram definidas quatro combinações de tempo e temperatura, das quais aquela que solubilizou a maior fracção de hemicelulose foi a de 190 °C, durante 10 min.

Neste caso, deu-se a solubilização de cerca de 75% da hemicelulose e uma variação da sua fracção para 12,8%. Observou-se a solubilização da celulose em cerca de 4% e um aumento da sua fracção para 58,3%. O conteúdo inicial de 18,6% de lenhina aumentou para 25,2%, após o pré-tratamento.

Zhang *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de quatro tecnologias de pré-tratamentos diferentes, de entre elas a explosão a vapor, efectuada a 160 °C, durante 5 min. O pré-tratamento provocou uma redução do conteúdo de hemicelulose, de 26,3% para 12,5%, e um aumento das fracções de celulose e de lenhina.

De modo a permitir uma comparação do conjunto dos resultados dos três trabalhos, que utilizaram o pré-tratamento com explosão a vapor, construiu-se a Tabela 5.1, na qual se indicam os valores referentes às celulose e hemicelulose.

Tabela 5.1 – Variação dos rácios e quantidades da celulose e da hemicelulose, após o pré-tratamento com explosão a vapor.

Autor	Condições do pré-tratamento	Variação			
		Fracção		Quantidade	
		Celulose	Hemicelulose	Celulose	Hemicelulose
Ballesteros <i>et al.</i> (2004)	T = 210 °C t = 2 min	+7%	-92%	-26%	-95%
Sipos <i>et al.</i> (2009)	T = 190 °C t = 10 min 2% SO <sub>2</sub>	+61%	-50%	-4%	-75%
Zhang <i>et al.</i> (2011)	T = 160 °C t = 5 min	+6%	-48%	nd	nd

nd – não disponível.

Pode afirmar-se que, embora o pré-tratamento efectuado por Ballesteros *et al.* (2004) tenha solubilizado a quase totalidade da hemicelulose, também causou a perda de uma parte significativa de celulose (26%). O trabalho de Sipos *et al.* (2009) aumentou consideravelmente o rácio de celulose disponível para a hidrólise subsequente, tendo apenas sido dissolvida uma quantidade de 4%, causando simultaneamente a dissolução de uma quantidade significativa de hemicelulose (75%).

### 5.1.2 Pré-tratamento alcalino

Salvi *et al.* (2010) efectuaram o pré-tratamento alcalino, com hidróxido de amónio, numa concentração de 28% (v/v), a uma temperatura de 160 °C, durante 1 h. Obtiveram taxas de remoção de 44% de lenhina, 35% de hemicelulose e menos de 10% de celulose.

Zhang *et al.* (2011) avaliou também a utilização de cal no pré-tratamento alcalino de bagaço de sorgo sacarino, tendo sido utilizado um tempo de residência de 1 h, a uma temperatura de 121 °C, com cal diluída a 1,5% (w/v). O resultado foi o da solubilização de uma fracção significativa de lenhina, tendo variado de 15,2% para 8,8%, bem como a solubilização da fracção de hemicelulose de 26,3% para 15,1%.

Sathesh-Prabu e Murugesan (2011) utilizaram uma fonte alternativa de materiais lenho-celulósicos do sorgo sacarino, i.e., alternativamente ao bagaço, produzido após a extracção do suco. Foram utilizados os resíduos que ficam no campo de cultivo, após a colheita. Uma vez que a matriz lenho-celulósica deste resíduo não difere das proporções encontradas no bagaço de sorgo, consideram-se relevantes os resultados obtidos por Sathesh-Prabu e Murugesan



(2011) para efeitos de comparação com os resultados obtidos nos trabalhos com bagaço de sorgo sacarino.

A máxima remoção de lenhina foi conseguida utilizando uma concentração de 2% de NaOH, com um tratamento térmico a uma pressão de 1 bar (a temperatura não é referida pelos autores), durante 1h, tendo os resíduos lenho-celulósicos posteriormente mantidos à temperatura ambiente de 26 °C, durante 8 h. Atingiu-se 64% de remoção da lenhina. Dados sobre a remoção da hemicelulose e da celulose não foram apresentados.

Wu *et al.* (2011) submeteram bagaço de sorgo sacarino, proveniente de duas variedades, ao pré-tratamento alcalino. Utilizaram diversos parâmetros de pré-tratamento com NaOH, variando a concentração da base, a uma temperatura de 25 °C, e tempo de residência até 2 h. A variedade de sorgo na qual se conseguiu maiores taxas de remoção de lenhina e de xilano foi a *Kyushuko04*, a uma concentração de 2,5M de NaOH, tendo sido removido 80% da lenhina e 80% do xilano, com perda de 5% de celulose.

Goshadrou *et al.* (2011) avaliaram os efeitos do pré-tratamento alcalino, com NaOH diluído a 12% (w/v), a uma temperatura de 0 °C, durante 180 min. Simultaneamente, aplicaram ultra-sons, com uma frequência de 25 kHz e uma potência de 50 W. Os resultados indicaram uma redução da fracção de lenhina de 18% para 11,4%. Observaram igualmente a redução em 33% da fracção de hemicelulose e um aumento da fracção de celulose de 48%.

A Tabela 5.2 resume os resultados obtidos por todos estes autores no pré-tratamento alcalino de resíduos lenho-celulósicos de sorgo.

Tabela 5.2 – Variação dos rácios e quantidades de lenhina, hemicelulose e celulose, após o pré-tratamento alcalino.

Autor	Condições do pré-tratamento	Variação	
		Fracção	Quantidade
Salvi <i>et al.</i> (2010)	T = 160 °C t = 60 min 28% NH <sub>4</sub> OH	nd	-44% lenhina -35% hemicelulose -10% celulose
Zhang <i>et al.</i> (2011)	T = 121 °C t = 60 min 1,5% cal	-42% lenhina -43% hemicelulose +22% celulose	nd
Satesh-Prabu e Murugusan (2011)	T = nd t = 60 min 2% NaOH	nd	-64% lenhina
Wu <i>et al.</i> (2011)	T = 25 °C t = 120 min 2,5M NaOH	nd	-80% lenhina -80% hemicelulose -5% celulose
Goshadrou <i>et al.</i> (2011)	T = 0 °C t = 180 min 12% NaOH Ultra-sons	-37% lenhina -33% hemicelulose +48% celulose	nd

nd – não disponível.

A totalidade dos dados dos diversos trabalhos não é passível de ser comparada, uma vez que alguns autores observaram a variação da fracção de cada um dos componentes, enquanto que outros, avaliaram a variação da sua quantidade. No entanto, é possível afirmar que todos os resultados indicam uma solubilização significativa da lenhina e da hemicelulose, sem perdas significativas de celulose.

### 5.1.3 Pré-tratamento ácido

Foi possível reunir resultados de dois estudos, nos quais foi utilizado o pré-tratamento ácido do bagaço de sorgo sacarino.

Zhang *et al.* (2011) efectuaram o pré-tratamento com ácido diluído, com uma concentração de 1% de ácido sulfúrico, a uma temperatura de 180 °C, durante 10 min. O resultado foi uma significativa redução da fracção de hemicelulose de 93%.

Por seu lado, Goshadrou *et al.* (2011) utilizaram o pré-tratamento com ácido concentrado, com uma concentração de ácido fosfórico de 85%, a uma temperatura de 50 °C, durante 30 min. O pré-tratamento fez reduzir a fracção de hemicelulose em 34%, enquanto que as fracções de celulose e de lenhina aumentaram 27% e 33%, respectivamente. Os autores, repetiram as condições do pré-tratamento, mas com aplicação de ultra-sons. Tal trouxe um aumento da dissolução das fracções de hemicelulose em 0,8%, e em 5,8% da fracção de lenhina, quando comparados com os valores sem ultra-sons.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos pelos pré-tratamentos ácidos. Por não terem um impacto significativo nos resultados e por representarem um dispêndio energético adicional, não se consideram os resultados obtidos com a utilização de ultra-sons.

Tabela 5.3 – Variação dos rácios e quantidades de lenhina, hemicelulose e celulose, após o pré-tratamento ácido.

<i>Autor</i>	<i>Condições do pré-tratamento</i>	<i>Variação da Fracção</i>
Zhang <i>et al.</i> (2011)	T = 180 °C t = 10 min 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+74% lenhina -93% hemicelulose +31% celulose
Goshadrou <i>et al.</i> (2011)	T = 50 °C t = 30 min 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	+33% Lenhina -34% Hemicelulose +27% Celulose

Note-se que os dois autores utilizaram aproximações diferentes, no que se refere à concentração de ácido e temperaturas. O trabalho de Zhang *et al.* (2011) apresenta a maior taxa de dissolução da hemicelulose, com a vantagem de minimizar a necessidade de

equipamentos menos resistentes à corrosão, mas com necessidade de maior consumo energético.

#### 5.1.4 Pré-tratamento com ALS

Tal como referido no Capítulo 3, o objectivo principal do pré-tratamento com água líquida sobreaquecida é o de solubilizar a hemicelulose em açúcares seus derivados, para sua posterior recuperação.

Dogaris *et al.* (2009) efectuaram o pré-tratamento a uma temperatura de 210 °C, durante 20 min, tendo a análise composicional demonstrado que houve uma despolimerização relativamente baixa da celulose (11%). Embora a despolimerização total da hemicelulose não tenha sido possível, houve uma dissolução de 83% da hemicelulose, cujo principal produto resultante foi a xilobiose.

Yu *et al.* (2011a) comparam dois processos diferentes utilizando o mesmo pré-tratamento. Compararam os resultados obtidos num processo efectuado por lotes (batch), com os resultados de um processo com fluxo de água quente passando pelo reactor. Neste último, fizeram variar o caudal volúmico de água ao longo do período do pré-tratamento. A temperatura aplicada foi de 184 °C, durante 18 min. As condições óptimas do pré-tratamento foram determinadas aplicando, durante os primeiros 8 min, um fluxo de 20 ml/min, seguido de 10 min com um fluxo de 10 ml/min. Os resultados indicaram uma dissolução de 79% da hemicelulose, dos quais cerca de 9%, resultaram em monómeros de xilose, sendo o restante recuperado maioritariamente como xilobiose. 5% da celulose foi dissolvida. Quando comparado com o processo por lotes, o processo com fluxo de água quente apresentou uma melhoria de 32%.

Num estudo posterior, Yu *et al.* (2011b), aplicando as mesmas condições anteriores de fluxo de água quente sobreaquecida, testaram o efeito da presença de vários sais metálicos durante o pré-tratamento. O melhor resultado foi obtido com a adição de uma solução com 0,1% de CuCl<sub>2</sub>, tendo-se atingido uma dissolução de 78%. Neste trabalho, 60% dos açúcares provenientes da hemicelulose foram recuperados como monómeros de xilose.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados determinados pelos autores que utilizaram o pré-tratamento com água quente sobreaquecida, no bagaço de sorgo sacarino.

Tabela 5.4 – Grau de dissolução da Hemicelulose e da Celulose, após pré-tratamento com água líquida sobreaquecida

Autor	Condições do pré-tratamento	Dissolução (%)		
		Hemicelulose	Monómeros de Xilose	Celulose
Dogaris <i>et al.</i> (2009)	T = 210 °C t = 20 min	83%	a)	11%
Yu <i>et al.</i> (2011a)	T = 184 °C t = 8 min (20 ml/min) + 10 min (10 ml/min)	79%	7%	5%
Yu <i>et al.</i> (2011b)	T = 184 °C t = 8 min (20 ml/min) + 10 min (10 ml/min) 0,1% CuCl <sub>2</sub>	78%	47%	6%

a) não disponível.

O trabalho de Yu *et al.* (2011b) apresentou resultados significativamente elevados ao nível da dissolução da hemicelulose e, simultaneamente, apresentou um grau elevado de recuperação de monómeros de xilose. O pré-tratamento com ALS, com a adição de CuCl<sub>2</sub>, permite um maior aproveitamento dos açúcares disponíveis no bagaço de sorgo sacarino, para posterior fermentação em bioetanol.

### 5.1.5 Pré-tratamento com AFEX

Tal como referido no Capítulo 3, o pré-tratamento por explosão de fibras de amoníaco é muito similar ao pré-tratamento com explosão a vapor, excepto que, no primeiro caso, o material pré-tratado resultante é um sólido, em vez de ser uma lama, como no segundo. O processo provoca uma modificação, ou a remoção da lenhina, mantendo intactas as fracções de celulose e de hemicelulose. Esta tecnologia apresenta como principal vantagem a de apresentar bons rendimentos na hidrólise enzimática, sendo necessárias celulasas e hemicelulasas para processar as pentoses que ficam no material.

Li *et al.* (2010) determinaram as condições óptimas do pré-tratamento AFEX, quantificando o grau de sacarificação de glicose e de xilose, após a hidrólise enzimática.

Antes de procederem ao pré-tratamento químico, estes autores procederam à trituração e à lavagem do bagaço de sorgo sacarino. Ao efectuarem a quantificação de glicose e de xilose, antes e depois da lavagem, concluíram que o bagaço após extracção do suco, ainda apresentava quantidades de cerca de 5 g/l de glicose. Por esse motivo, a água de lavagem foi guardada para utilização posterior no processo de fermentação, cujos resultados se apresentam no subcapítulo 5.3.

Nas Figura 5.1 e Figura 5.2, que representam o bagaço antes e após lavagem, respectivamente, pode observar-se a diferença do teor de glicose, após o pré-tratamento (Figura 5.1), levando os autores a concluir que o pré-tratamento causa a degradação da glicose, tornando-se necessária a sua remoção prévia.

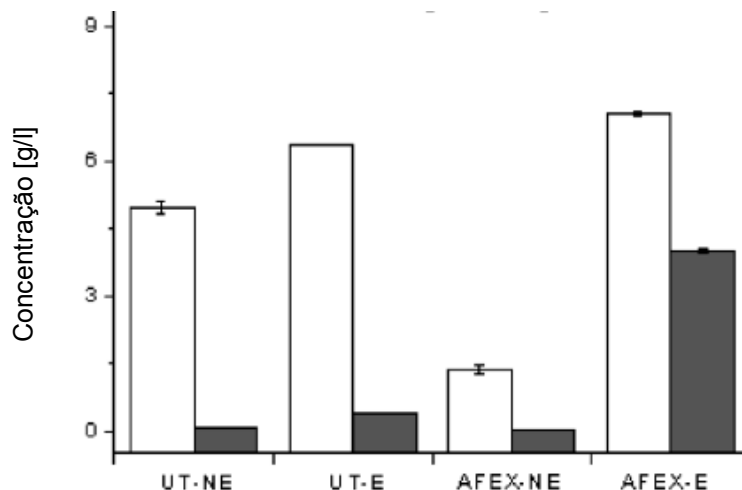


Figura 5.1 – Efeito do pré-tratamento AFEX na concentração de glicose (barras brancas), e de xilose (barras cinzentas), presente no bagaço de sorgo sacarino sem lavagem. “UT-NE” bagaço sem pré-tratamento e sem carga enzimática; “UT-E” bagaço sem pré-tratamento e com carga enzimática; “AFEX-NE” bagaço após pré-tratamento sem carga enzimática; “AFEX-E” bagaço após pré-tratamento e com carga enzimática (Li *et al.*, 2010).

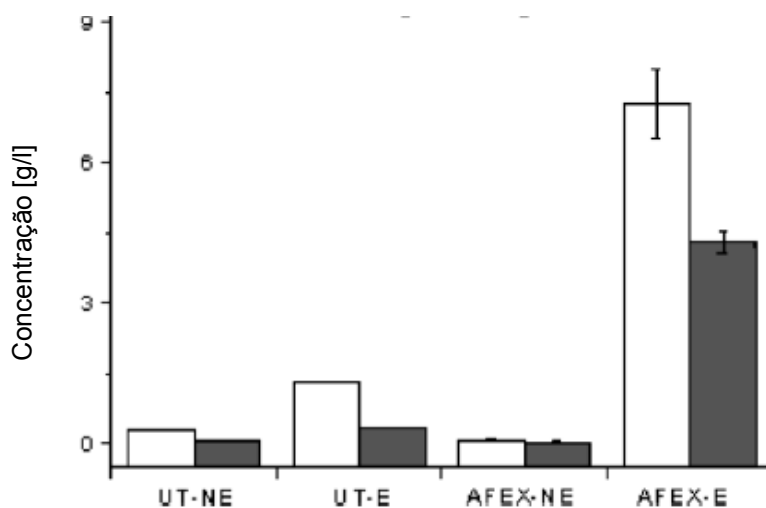


Figura 5.2 – Efeito do pré-tratamento AFEX na concentração de glicose (barras brancas), e de xilose (barras cinzentas), presente no bagaço de sorgo sacarino após lavagem. “UT-NE” bagaço sem pré-tratamento e sem carga enzimática; “UT-E” bagaço sem pré-tratamento e com carga enzimática; “AFEX-NE” bagaço após pré-tratamento sem carga enzimática; “AFEX-E” bagaço após pré-tratamento e com carga enzimática (Li *et al.*, 2010).

As condições óptimas determinadas pelos autores, para o pré-tratamento do bagaço de sorgo sacarino, foram uma temperatura de 140 °C, tempo de residência de 30 min, e uma relação de amoníaco:biomassa de 2:1. Os dados da hidrólise enzimática, que permitiram determinar as condições óptimas do pré-tratamento, são apresentados no subcapítulo seguinte.

## **5.2 Efeitos da hidrólise enzimática**

Do universo de trabalhos publicados, apresentam-se aqueles que apresentaram os resultados mais relevantes. Tal opção deve-se ao facto de, por um lado, nem todos os autores terem efectuado o processo de hidrólise, tendo analisado apenas os efeitos dos pré-tratamentos e, por outro, outros autores terem apenas analisado o resultado na produtividade de bioetanol, sem terem avaliado o grau de sacarificação prévia.

Os resultados analisados incidem, essencialmente, sobre o grau de conversão de celulose em glicose. No entanto, apresentam-se, sempre que disponíveis, os resultados de hidrólise da xilose (por ser este o principal açúcar constituinte da hemicelulose), ou da totalidade de recuperação de açúcares, que foram possíveis de identificar.

A percentagem de conversão da celulose em glicose, obtida na maioria dos trabalhos em análise, foi superior a 80%. Apenas serão considerados esses trabalhos, pertencentes a um subconjunto de sete publicações.

### **5.2.1 Hidrólise após pré-tratamento com explosão a vapor**

Sipos *et al.* (2009) testaram o efeito de várias condições de temperatura e tempo de residência durante o pré-tratamento com explosão a vapor, com adição de SO<sub>2</sub>. Os autores efectuaram a hidrólise enzimática das lamas resultantes do pré-tratamento, isto é, sem a separação das fases líquidas e sólidas, utilizando as enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e Novozym 188, a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. A evolução dos graus de conversão de glicose e de xilose é apresentada na Figura 5.3.

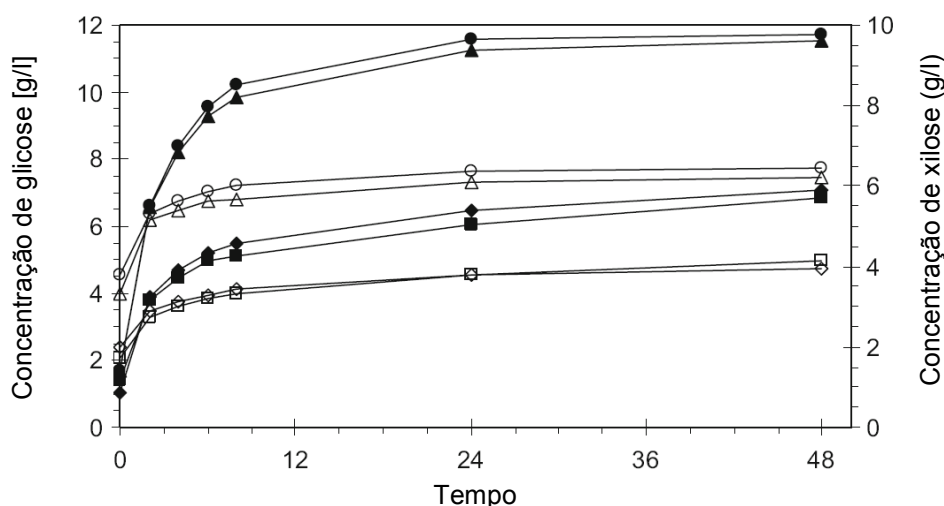


Figura 5.3 – Evolução da concentração de glicose (símbolos fechados) e de xilose (símbolos abertos), durante a hidrólise, após pré-tratamento com explosão a vapor. Condições do pré-tratamento: 180 °C, 10 min (quadrados), 190 °C, 5 min (losangos), 190 °C, 10 min (triângulos), 200 °C, 5 min (círculos) (Sipos *et al.*, 2009).

Os valores finais de concentração de glicose obtidos foram de entre 11 a 12 g/l, nas condições de pré-tratamento mais severas. Uma vez que a quantidade de xilano é consideravelmente elevada, a concentração de xilose no hidrolisado foi também considerável, tendo atingido valores entre 6 e 6,5 g/l, nas mesmas condições de pré-tratamento. Estes resultados demonstram que a quantidade de xilose contabiliza cerca de um terço da quantidade total de açúcares no hidrolisado. Por essa razão, uma fermentação eficiente requer um microrganismo capaz de fermentar ambos os açúcares para a produção de bioetanol (Sipos *et al.*, 2010).

Os mesmos autores repetiram a hidrólise enzimática, nas mesmas condições anteriores, mas somente utilizando a fracção sólida, previamente separada das lamas e sujeita a lavagem. A vantagem da separação das fracções líquidas e sólidas é a de que a fracção líquida, rica em xilose, pode ser utilizada para fermentação de pentoses, produção de celulasas, ou para a transformação em vários produtos valorizáveis (Sipos *et al.*, 2009). A Figura 5.4 mostra as taxas de conversão final de glicose, após 48 h de hidrólise, das lamas (barras brancas) e das fibras separadas (barras cinzentas).

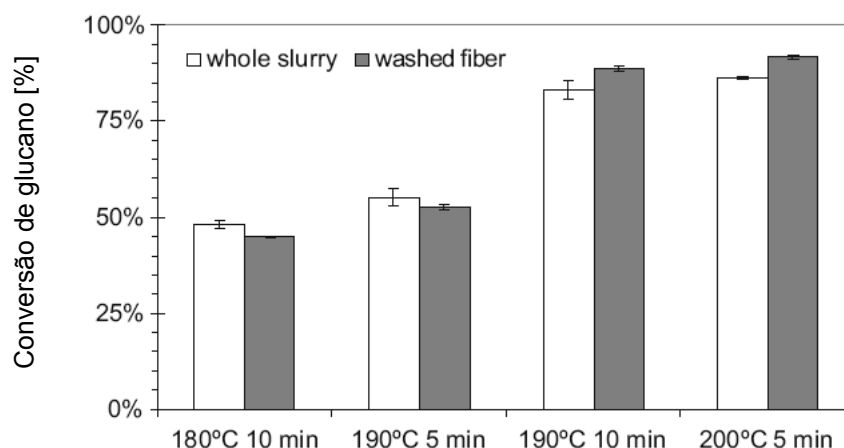


Figura 5.4 – Efeito da separação da fracção líquida na hidrólise do bagaço de sorgo sacarino, pré-tratado com explosão a vapor, após 48 h de hidrólise (“whole slurry” – lamas; “washed fibers” – fibras separadas) (Sipos *et al.*, 2009).

Os resultados de conversão são apresentados como percentagem da produção máxima teórica, calculada com base na quantidade de glicose potencial presente no material pré-tratado (Sipos *et al.*, 2009).

Utilizando condições de pré-tratamento mais severas (190 °C, 10 min e 200 °C, 5 min) atingiram-se taxas de conversão das lamas de 83% e 86%, respectivamente. As fibras separadas do bagaço pré-tratado atingiram taxas de conversão de 89% e 92% nas condições de 190 °C, 10 min e 200 °C, 5 min, respectivamente. No caso dos pré-tratamentos mais severos, as fibras separadas e lavadas, apresentaram taxas de conversão de cerca de 7% mais elevadas, quando comparadas com as taxas de conversão da hidrólise das lamas.

## 5.2.2 Hidrólise após pré-tratamento alcalino

Salvi *et al.* (2010) efectuaram a hidrólise utilizando uma mistura de enzimas Spezyme CP, contendo celulasas, e Novozyme 188, contendo  $\beta$ -glucosidades, durante 24 h. A temperatura da hidrólise foi de 50 °C. O pré-tratamento alcalino, descrito no subcapítulo 5.1.2., manteve, no material remanescente, 90% da celulose e 65% da hemicelulose.

Após a sacarificação de 24 h, a concentração de glicose da biomassa pré-tratada foi de 47 g/l e a de xilose de 17 g/l. A Figura 5.5 apresenta a variação da quantidade de açúcares ao longo de 48 h, das quais, as primeiras 24 h dizem respeito ao processo de hidrólise, sendo as restantes 24 h respeitantes ao processo de fermentação. Pode observar-se que o bagaço pré-tratado (assinalado com dois asteriscos) apresenta taxas de conversão de glicose e de xilose bastante mais elevadas, quando comparadas com o bagaço sem pré-tratamento (assinalado com um asterisco).



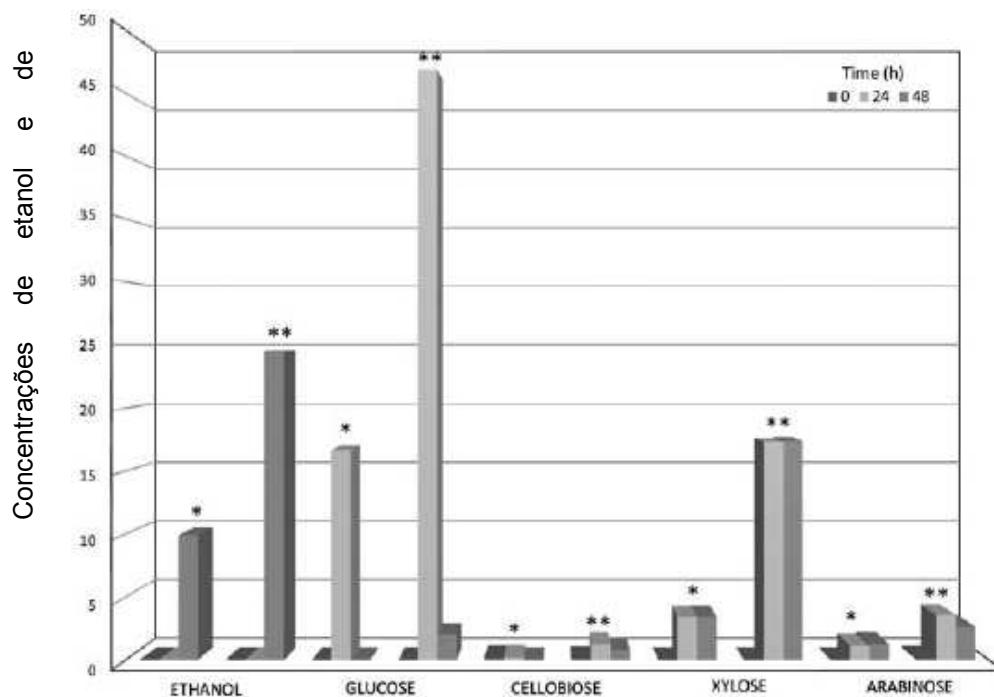


Figura 5.5 – Hidrólise enzimática e fermentação do bagaço de sorgo sacarino, sem pré-tratamento, e após pré-tratamento alcalino (Salvi *et al.*, 2010).

O melhor resultado obtido para a taxa de conversão de celulose em glicose foi de 84% (a taxa de conversão de xilose não foi determinada pelos autores).

Goshadrou *et al.* (2011), após pré-tratamento alcalino (NaOH) com a baixa temperatura, efectuaram hidrólise enzimática aplicando uma combinação de celulasas Celluclast 1.5 L e Novozyme 188, a uma temperatura de 45 °C, durante 72 h. A melhor taxa de conversão de celulose em glicose foi de 92%. Os autores efectuaram também o pré-tratamento sem a aplicação de ultra-sons, tendo-se obtido uma ligeira perda de celulose. No entanto, a taxa de conversão em glicose foi idêntica à anterior, o que levanta a hipótese de avaliar a necessidade da utilização de ultra-sons durante o pré-tratamento, de forma a minimizar as necessidades energéticas do processo global.

Wu *et al.* (2011) utilizaram duas variedades de sorgo sacarino no seu estudo. Após pré-tratamento alcalino, com uma concentração de 2,5 M NaOH, efectuaram a hidrólise enzimática utilizando uma combinação de enzimas idêntica ao trabalho de Goshadrou *et al.* (2011) (Celluclast 1.5 L e Novozyme 188). Esta combinação de enzimas foi operada a uma temperatura de 50 °C, durante um período de tempo até 96 h. A Figura 5.6 apresenta o efeito de diferentes concentrações de NaOH, utilizadas no pré-tratamento, na taxa de conversão de glucano.

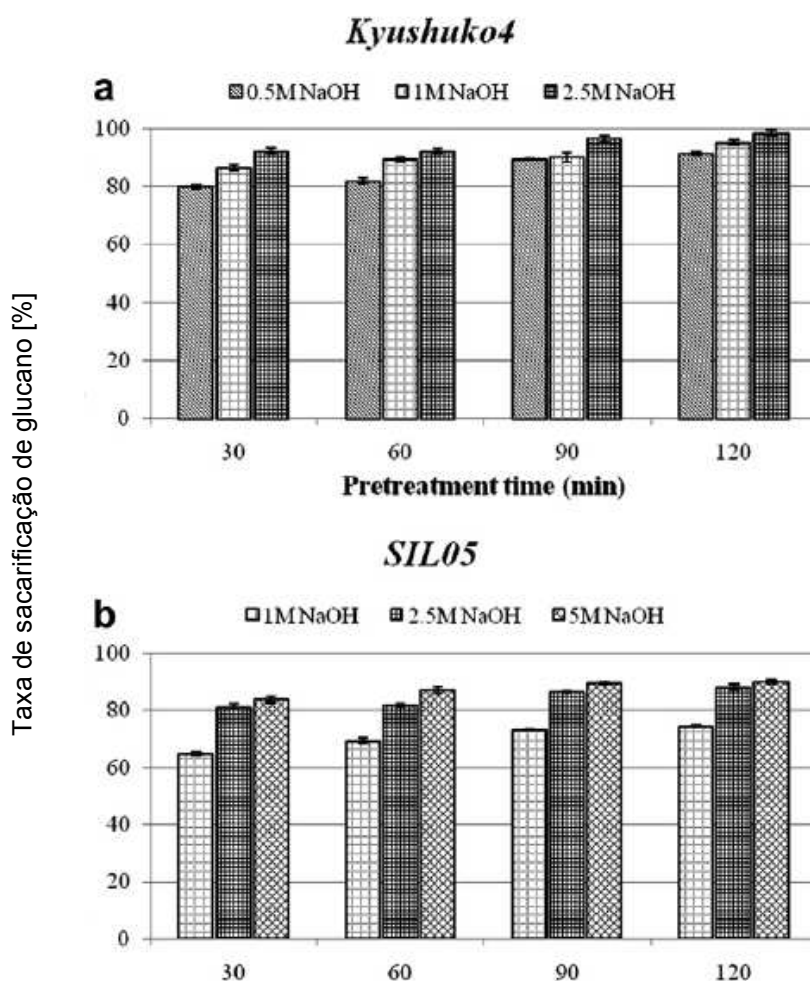


Figura 5.6 – Taxa de conversão de glucano em glicose, após 24 h, do bagaço de duas variedades de sorgo sacarino após pré-tratamento alcalino (Wu *et al.*, 2011).

Ao fim de 24 h, os autores obtiveram uma taxa de conversão de celulose em glicose de 98,7%, utilizando a variedade *kyushuko4*. No mesmo estudo, o resultado obtido após hidrólise da variedade *SIL05*, foi de 85%, sob as mesmas condições de pré-tratamento. Os autores referem que esta diferença nos resultados da conversão de celulose em glicose poderá dever-se a diferenças entre as suas características estruturais, já que as quantidades de celulose, hemicelulose e lenhina, não diferem significativamente nas duas variedades.

### 5.2.3 Hidrólise após pré-tratamento com ALS

Em ambos os trabalhos de Yu *et al.* (2011a e 2011b), os autores analisaram os efeitos do processo de pré-tratamento com água líquida sobreaquecida, concluindo que os resultados podem ser otimizados utilizando um fluxo variável de água durante o pré-tratamento. Na hidrólise enzimática, os resíduos sólidos provenientes do pré-tratamento foram submetidos a testes de digestibilidade na presença de celulasas comerciais, a uma temperatura de 50 °C,

durante 72 h. A Figura 5.7 representa a digestibilidade enzimática, definida como o rácio de glicose por 100g de glicose potencial no substrato.

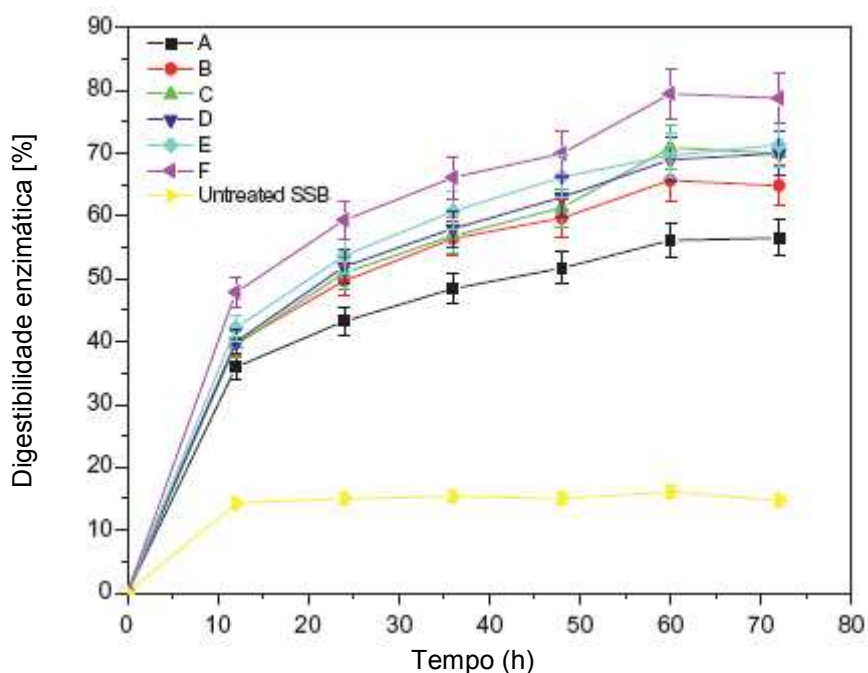


Figura 5.7 – Digestibilidade enzimática sob diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de sorgo sacarino. “Untreated SSB” – sem pré-tratamento; “A” – pré-tratamento por lotes, 18 min, 184 °C; “B” – fluxo variável 0 ml/min, 8 min + 10 ml/min, 10 min, 184 °C; “C” - fluxo variável 5 ml/min, 8 min + 10 ml/min, 10 min, 184 °C; “D” - fluxo variável 10 ml/min, 8 min + 10 ml/min, 10 min, 184 °C; “E” – fluxo variável 20 ml/min, 8 min + 10 ml/min, 10 min, 184 °C; “F” – fluxo variável 30 ml/min, 8 min + 10 ml/min, 10 min, 184 °C (Yu *et al.*, 2011a).

A digestibilidade máxima de 80% da celulose foi obtida após condições de pré-tratamento com um fluxo de água quente sobreaquecida de 30 ml/min, durante os primeiros 8 min, seguido de um fluxo de 10 ml/min, durante 10 min, a uma temperatura de 184 °C. No entanto, nestas condições de pré-tratamento, houve uma menor dissolução da hemicelulose.

Num trabalho posterior (Yu *et al.*, 2011b), os autores avaliaram o efeito da presença de sais metálicos, em diferentes concentrações, na solubilização da hemicelulose e na recuperação de monómeros de xilose. A presença de  $\text{CuCl}_2$ , além de permitir uma maior dissolução da hemicelulose, também melhorou a taxa de recuperação dos monómeros de xilose, tal como referido no subcapítulo 5.1.4.

A hidrólise enzimática também demonstrou ser susceptível à presença de  $\text{CuCl}_2$  no material lenho-celulósico, ao fim de 42 h, a 50 °C, tal como demonstra a Figura 5.8.

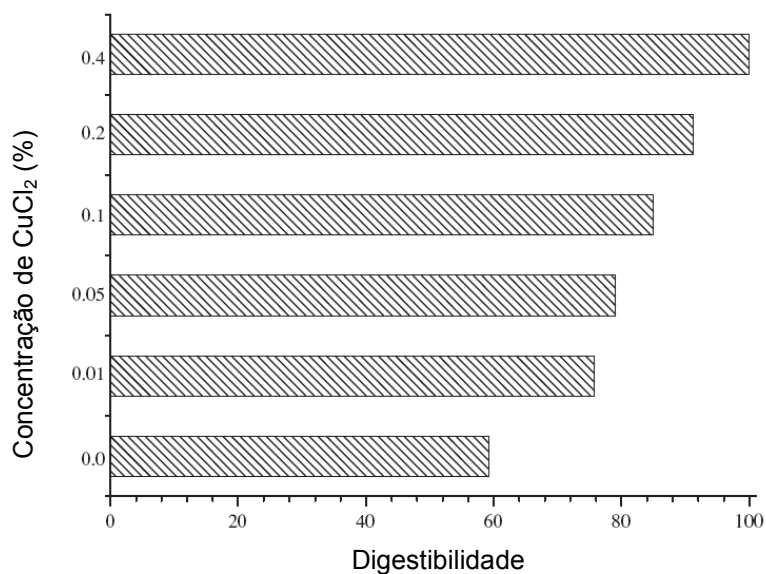


Figura 5.8 – Digestibilidade enzimática do bagaço de sorgo sacarino após 48 h, na presença de várias concentrações de  $\text{CuCl}_2$  (Yu *et al.*, 2011b).

Embora tenha sido possível obter-se percentagens de digestibilidade enzimática de quase 100%, a uma concentração de 0,4% de  $\text{CuCl}_2$ , a degradação de hemicelulose foi maior nessas condições, minimizando a taxa total de recuperação de açúcares. Considerando uma concentração de 0,1% de  $\text{CuCl}_2$ , foi possível obter uma taxa de conversão de celulose em glicose de cerca de 84%, e uma taxa total de recuperação de açúcares (glicose e xilose) de 90,2%. Deste modo, foi possível otimizar o rendimento de açúcares para posterior fermentação em bioetanol. Refira-se que, nesta experiência, os autores necessitaram de menos 24 h de reacção em relação ao ensaio sem a utilização de sais metálicos (Yu *et al.*, 2011b).

#### 5.2.4 Hidrólise após pré-tratamento com AFEX

Li *et al.* (2010) efectuaram o pré-tratamento AFEX do bagaço de sorgo sacarino, tal como referido no subcapítulo 5.1.5. Os autores, ao utilizarem as águas de lavagem do bagaço de sorgo, conseguiram aumentar a quantidade de açúcares monossacarídeos disponíveis.

Após a hidrólise enzimática, a qual foi efectuada utilizando as celulasas Spezyme CP e  $\beta$ -glicosidase Novo 188, e a xilanase Multifect xylanase, durante 72 h, a uma temperatura de 50°C, e nas condições óptimas de pré-tratamento, foi possível, obter um grau de conversão de glucano em glicose de 68%, e de xilano em xilose de 88%.

### 5.2.5 Comparação global dos resultados obtidos nos diferentes processos de pré-tratamentos e hidrólises

A Tabela 5.5 resume os resultados obtidos em termos de taxas de recuperação de açúcares, após os diferentes pré-tratamentos a que os bagaços de sorgo foram submetidos.

Tabela 5.5 – Taxas de conversão de açúcares após pré-tratamento.

Autor	Pré-tratamento	Hidrólise	
		Condições	Taxa de conversão em açúcares
Sipos <i>et al.</i> (2009)	Explosão a vapor, com SO <sub>2</sub>	T = 50 °C t = 48 h	92% de celulose em glicose
Salvi <i>et al.</i> (2010)	Alcalino	T = 50 °C t = 24 h	84% de celulose em glicose
Goshadrou <i>et al.</i> (2011)		T = 45 °C t = 72 h	92% de celulose em glicose
Wu <i>et al.</i> (2011)		T = 50 °C t = 24 h	99% de celulose em glicose
Yu <i>et al.</i> (2011b)	ALS	T = 50 °C t = 72 h	84% de celulose em glicose 90% total de açúcares
Li <i>et al.</i> (2010)	AFEX	T = 50 °C t = 72 h	68% de celulose em glicose 88% de xilano em xilose

A taxa de conversão de celulose em glicose foi maior após o pré-tratamento alcalino, atingindo-se quase 100%. O pré-tratamento com água líquida sobreaquecida permitiu atingir um grau de conversão total de açúcares (glicose e xilose) de 90%.

### 5.3 Fermentação de bagaço de sorgo sacarino

Neste subcapítulo pretende-se apresentar os resultados da produção de bioetanol obtidos por diversos autores a partir do bagaço de sorgo sacarino.

Um indicador que mede a eficiência da fermentação de açúcares em bioetanol é o resultado do quociente entre a quantidade de bioetanol produzida pela quantidade máxima teórica (0,51 g de bioetanol por cada grama de açúcar), apresentado em termos percentuais. A percentagem face ao máximo teórico é considerada, neste trabalho, como o valor que permite comparar os resultados obtidos pelos diversos autores.

Organizaram-se os resultados de produção de bioetanol por tipologia de açúcares fermentados, ou seja, apresentaram-se inicialmente os valores determinados nos processos

em que foi fermentada unicamente a glicose, seguidos dos resultados obtidos na fermentação da xilose e, por último, os resultados obtidos quando os dois açúcares foram fermentados no mesmo caldo. Deste modo é possível adquirir uma percepção dos mecanismos que utilizam de forma mais eficiente os principais açúcares obtidos a partir dos materiais lenho-celulósicos presentes no bagaço de sorgo sacarino.

### 5.3.1 Fermentação da Glicose

Ballesteros *et al.* (2004) foram os únicos autores, do universo de publicações considerado, que utilizaram a estratégia de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS) do bagaço de sorgo sacarino, após o pré-tratamento do material lenho-celulósico com explosão a vapor.

A SFS requer condições de fermentação e de sacarificação compatíveis, com idênticos valores de pH e, temperatura e com uma concentração ótima de substrato. Um dos problemas associados à SFS é a diferença entre as temperaturas ótimas de fermentação e de sacarificação, tornando-se necessária a utilização de leveduras termo-tolerantes, capazes de fermentar a glicose em bioetanol, a temperaturas acima dos 40 °C, próximas das temperaturas ótimas da actividade do complexo celulolítico (Ballesteros *et al.*, 2004).

Ballesteros *et al.* (2004) utilizaram, nesse trabalho, as celulasas comerciais Celluclast 1.5 L, em conjunto com a levedura termo-tolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. A sacarificação e a fermentação foram efectuadas a uma temperatura de 42 °C, durante um período de tempo até 160 h. A Figura 5.9 apresenta as curvas de produção de bioetanol, e de consumo de glicose, ao longo do tempo.

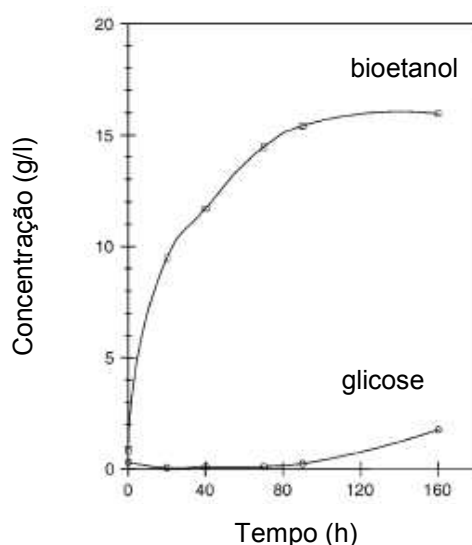


Figura 5.9 – Performance da *K. marxianus* CECT 10875 na SFS, a 42 °C, concentração de substrato de 10 % (w/v) (Ballesteros *et al.*, 2004).

Durante a primeira etapa da SFS verificou-se um incremento contínuo da produção de bioetanol, enquanto que a quantidade de glicose se manteve muito baixa, demonstrando uma boa actividade da levedura. A partir das 82 h, a quantidade de glicose começou a aumentar, indicando a cessação da fermentação e a continuação da actividade hidrolítica da celulose. O desempenho da levedura pode ser afectado, quer por baixas concentrações de glicose, que resultam em “stress” metabólico, quer pela presença de bioetanol no meio de fermentação (Ballesteros *et al.*, 2004).

A produção de bioetanol que foi atingida ao fim de 82 h foi de 16 g/l, a que corresponde a um rendimento de 60,9% face ao máximo teórico. Os autores assumiram que este valor de rendimento foi reduzido, comparativamente aos processos de produção industrial de bioetanol.

Sipos *et al.* (2009) efectuaram a fermentação do bagaço de sorgo, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a uma temperatura de 30 °C, durante 24 h, e a um valor de pH de 5,0. Foi fermentada a fracção sólida, previamente separada, das lamas provenientes do pré-tratamento com explosão a vapor (com adição de SO<sub>2</sub>), a qual foi posteriormente sujeita a hidrólise enzimática. Foi possível atingir um rendimento de produção de bioetanol entre 80% e 90%.

Salvi *et al.* (2010) pré-trataram o material lenho-celulósico com hidróxido de amónio. As condições de fermentação foram a 30 °C, durante 24 h, utilizando a levedura *S. cerevisiae* D5A. No final da fermentação obteve-se uma produção de 24 g/l de bioetanol, correspondente a 84% face ao máximo teórico. Com o material sem pré-tratamento, conseguiu-se uma produção correspondente de 44%.

Goshadrou *et al.* (2011) optaram por utilizar o fungo filamentosso *Mucor hiemalis*, por assumirem que se trata de um microrganismo pouco estudado. O hidrolisado foi submetido a uma fermentação de 60 h, a uma temperatura de 32 °C e a um valor de pH de 5,5. A Figura 5.10 apresenta os resultados da percentagem de produção de bioetanol, face ao valor teórico, e demonstra as melhorias significativas atingidas após o pré-tratamento do material lenho-celulósico, de 49% para o material sem pré-tratamento, para 76%-81% para os diferentes pré-tratamentos aplicados. De acordo com a Figura 5.10, foi possível obter um rendimento de produção de bioetanol de 81%, aplicando o pré-tratamento com NaOH, com a adição de ultra-sons.

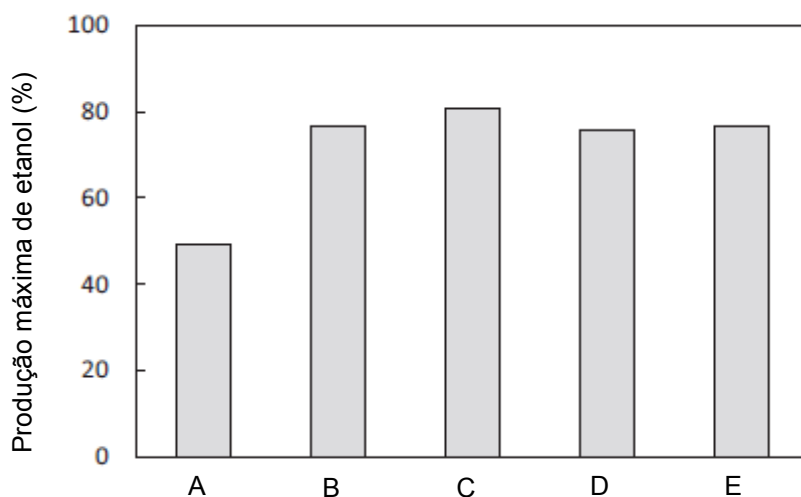


Figura 5.10 – Máxima produção de bioetanol (% do valor teórico). (A) Sem pré-tratamento, (B) Pré-tratamento com NaOH, (C) Pré-tratamento com NaOH + ultra-sons, (D) Pré-tratamento com ácido fosfórico, (E) Pré-tratamento com ácido fosfórico + ultra-sons (Goshadrou *et al.*, 2011).

### 5.3.2 Fermentação da Xilose

Kurian *et al.* (2010) compararam o desempenho de dois microrganismos que fermentam a xilose. Isolou a *Deboryomyces hansenii* sp. a partir de vários substratos enriquecidos com D-xilose, e comparou esta levedura com a *Pichia stipitis* NCIM 3497.

Previamente efectuou a hidrólise ácida, com ácido diluído, do material lenho-celulósico de sorgo sacarino, em condições que permitissem recuperar a maior parte de hemiceluloses (140 °C, 30 min, concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,5%). A concentração de açúcares redutores obtida no hidrolisado foi de 92 g/l. A quantidade de cada açúcar no hidrolisado, bem como a composição da matriz lenho-celulósica do bagaço de sorgo sacarino, não é referida pelos autores, não sendo possível saber quais eram as fracções de xilose e de glicose presentes no caldo de fermentação (razão pela qual este trabalho não foi mencionado nos dois subcapítulos anteriores).

A fermentação que apresentou melhores resultados foi com a utilização da *P. stipitis* NCIM 3497, a qual apresentou uma produção de bioetanol de 38,7 g/l, correspondente a uma produção, face ao máximo teórico, de 82,5%. As condições de temperatura, tempo de fermentação e de pH não foram referidas pelos autores.



### 5.3.3 Co-Fermentação da Glicose e Xilose

Para a fermentação conjunta da glicose e xilose identificou-se o trabalho Li *et al.* (2010), no qual foi utilizado um único microrganismo. As condições e os resultados do pré-tratamento e da hidrólise enzimática foram descritos nos subcapítulos 5.1.5. e 5.2.4., respectivamente.

A fermentação foi efectuada utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 424A, geneticamente modificada para fermentar também as pentoses. As condições de fermentação foram mantidas a 30 °C, pH=6, durante 100 h. O rendimento da produção de bioetanol, utilizando a água de lavagem do bagaço de sorgo sacarino, foi de 96,9% face ao máximo teórico, tendo sido este o valor mais elevado no universo de publicações revisto. A título comparativo, os autores atingiram um rendimento de produção de bioetanol de 82,2% de produção, sem utilização das águas de lavagem.

### 5.3.4 Comparação global dos resultados obtidos nos processos de fermentação

A Tabela 5.6 resume os resultados obtidos no processo de fermentação, indicando-se os valores máximos de produção face ao valor teórico, as condições de operação, e os microrganismos utilizados.

Tabela 5.6 – Rendimentos de fermentação de bagaço de sorgo sacarino em bioetanol.

Autor	Condições de fermentação	Microrganismo	Rendimento da fermentação (%)
<i>Fermentação da Glicose</i>			
Ballesteros <i>et al.</i> (2004)	T = 42 °C t = 82 h	<i>K. marxianus</i>	61
Sipos <i>et al.</i> (2009)	T = 30 °C t = 24 h	<i>S. cerevisiae</i>	80 - 90
Salvi <i>et al.</i> (2010)	T = 30 °C t = 24 h	<i>S. cerevisiae</i> D5A	84
Goshadrou <i>et al.</i> (2011)	T = 32 °C t = 60 h	<i>M. hiemalis</i>	81
<i>Fermentação da Xilose</i>			
Kurian <i>et al.</i> (2010)	nd	<i>P. stipitis</i> NCIM 3497	83
<i>Co-fermentação da Glicose e Xilose</i>			
Li <i>et al.</i> (2010)	T = 30 °C t = 100 h	<i>S. cerevisiae</i> 424A	97

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

O sorgo sacarino apresenta vantagens como cultura energética porque, além de se adaptar a diferentes condições edafo-climáticas, produz três tipos de produtos, todos passíveis de serem convertidos em bioetanol: o açúcar, presente no seu sumo, o grão, rico em amido, e o bagaço, constituído por materiais lenho-celulósicos. Esta abrangência de materiais constitui um conjunto de matérias-primas que permitem a optimização do seu aproveitamento para a produção de bioetanol – um biocombustível renovável.

A utilização de materiais lenho-celulósicos levanta desafios associados à optimização da produção de açúcares, necessários ao processo de fermentação, bem como à optimização do processo de fermentação que permita fermentar as pentoses e hexoses, de modo a aumentar a produção de bioetanol.

A escolha do tipo de pré-tratamento é determinante para a eficiência dos processos que se pretendem executar a jusante, nomeadamente no que se referem ao tipo de açúcares que se pretendem fermentar.

Os pré-tratamentos alcalinos, seguidos de hidrólise enzimática, são aqueles que apresentaram os melhores resultados na conversão da celulose em glicose, tendo-se atingido um rendimento máximo de conversão de 98,7%.

Contabilizando a recuperação total de açúcares (glicose e xilose), foi registado uma taxa total de recuperação de 90%, após pré-tratamento com ALS, resultado que se considera interessante. Este pré-tratamento apresenta a vantagem de não necessitar de produtos químicos e de permitir recuperar uma elevada quantidade de pentoses. Além disso, este pré-tratamento não requer a utilização posterior de enzimas para digerir a hemicelulose, uma vez que esta já foi dissolvida no pré-tratamento. A principal desvantagem é a de necessitar de elevados requisitos energéticos, necessários para manter o reactor a pressões elevadas.

A melhor rentabilidade de produção de bioetanol foi obtida com o pré-tratamento com AFEX, seguido de hidrólise enzimática, tendo-se registado um valor de 97% de produção de bioetanol, face ao máximo teórico. Para atingir este resultado, foi utilizado um único organismo, a *S. cerevisiae* 424A (geneticamente modificada), adicionando-se as águas provenientes da lavagem do bagaço de sorgo sacarino, ricas em glicose, o que justifica a sua utilização, sempre que possível.

Como vias de investigação futura, sugere-se a experiência de fermentação, antecedida de pré-tratamento com ALS e hidrólise enzimática, e com um único microrganismo, atendendo aos bons resultados na quantidade de pentoses e hexoses obtidos.

Por investigar fica também a utilização de outros tipos de microrganismos capazes de fermentar em conjunto as pentoses e hexoses. Embora tenham sido atingidas taxas de conversão elevadas com a *S. cerevisiae* 424A, interessa saber se outros microrganismos são mais adequados e mais eficientes, nomeadamente no que respeita à sua tolerância a outras gamas de temperaturas e pH.

O estudo de outras variedades de sorgo sacarino também requer sistematização, uma vez que foram registados diferenças significativas de resultados, quando se utilizaram diferentes variedades. Embora não se tenham registado diferenças significativas ao nível da composição da matriz lenho-celulósica, poderão haver diferenças ao nível da sua organização da sua estrutura, que a tornem mais susceptível aos processos de pré-tratamento e hidrólise.

Por último, é necessário considerar a hipótese de testar outros tipos de pré-tratamentos, que foram descritos, mas que não foram aplicados por nenhum dos autores, nomeadamente a extrusão, a degradação biológica, ou a utilização de líquidos iónicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIE – Agência Internacional de Energia (2008a) *From 1<sup>st</sup>- to 2<sup>nd</sup>- generation biofuel technologies*. OECD/IEA, Paris.
- AIE – Agência Internacional de Energia (2008b) *Energy technology perspectives*. OECD/IEA, Paris.
- AIE – Agência Internacional de Energia (2010) *Sustainable production of second-generation biofuels*. OECD/IEA, Paris.
- Almodares A., Hadi M. R. (2009) Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 4: 772-780.
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M. J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101: 4851-4861.
- Carroll A., Somerville C. (2009) Cellulosic Biofuels. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 165-182.
- Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52: 858-875.
- Balat M., Balat H., Öz C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551-573.
- Ballesteros M., Oliva J. M., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39: 1843-1848.
- Bantilan M. C. S., Deb U. K., Gowda C. L. L., Reddy B. V. S., Obilana A. B., Evenson RE. (eds.) (2004) *Sorghum genetic enhancement: research process, dissemination and impacts*. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Bassam N. (2010) *Handbook of bioenergy crops – A complete reference to species, development and applications*. Earthscan, London.
- CETA – Centre for theoretical and applied ecology (2011) *Sweetanol Early Manual*. Poligrafiche San Marco S.a.s. Cormons (Gorizia), Italy.

Decreto-Lei n.º 62/2006 de 21 de Março. Diário da República n.º 57 – I Série-A. Ministério da Economia e da Inovação.

Demirbas A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, 27: 327-337.

Demirbas A. (2008) The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. *Energy Sources*, 3: 177-185.

Demirbas A. (2011) Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, 88: 17-28.

Demirbas M. F., Balat M. (2006) Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuel: A global perspective. *Energy Conversion and Management*, 47: 2371-2381.

Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 258-266.

Directiva n.º 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 08 de Maio de 2003, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. Jornal Oficial da União Europeia L 123 de 17/5/2003, p. 42-46.

Directiva n.º 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE e 2003/30/CE. Jornal Oficial da União Europeia L 140 de 5/6/2009, p. 16-62.

Dogaris I., Karapati S., Mamma D., Kalogeris E., Kekos D. (2009) Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. *Bioresource Technology*, 100: 6543-6549.

EIA – U. S. Energy Information Administration. [www.eia.gov](http://www.eia.gov), acedido em 15 de Outubro de 2011.

Fernandez J. e Curt M. D. (2005) New energy crops for bioethanol production in the Mediterranean region. *International Sugar Journal*, 107: 622-627.

Fernando A., Duarte P., Morais J., Oliveira J. S. (2007) Characterization of sweet, fibre and biomass sorghum potential in Portugal as an industrial and energy feedstock. In: Carvalho M. G., Afgan N. H. (eds.) (2004) New and renewable energy technologies for sustainable development, Proceedings of Renewables 2004, 28 Junho – 1 Julho 2004, Évora, Portugal. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., p. 183-192.

Goshadrou A., Karimi K., Taherzadeh M. J. (2011) Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Industrial Crops and Products*, 34: 1219-1225.

- Gupta R. B., Demirbas A. (2010) Gasoline, diesel, and ethanol biofuels from grasses and plants. Cambridge University Press, New York.
- Hamelinck C. N., Van Hooijdonk G., Faaij A. P. C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28: 384-410.
- Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M. F., Lidén G., Zacchi G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24: 549-556.
- Hayes D. J. (2009) An examination of biorefining processes, catalyst and challenges. *Catalysis Today*, 145: 138-151.
- Jørgensen H., Kristensen J. B., Felby C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulosic into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1: 119-134.
- Karuranithy C., Muthukumarappan K. (2010) Effects of extruder parameters and moisture content of Switchgrass, Prairie Cord Grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (6): 1785-1803.
- Karuranithy C., Muthukumarappan K. (2011) Influence of extruder and feedstock variables on torque requirement during pretreatment of different types of biomass – A response surface analysis. *Biosystems Engineering*, 109: 37-51.
- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48: 3713-3729.
- Kurian J. K., Minu A. K., Banerji A., Kishore V. V. N. (2010) Bioconversion of hemicellulose hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Debaryomyces hansenii* sp. *Bioresources*, 5: 2404-2416.
- Li B.-Z., Balan V., Yuan Y., Dale B. (2010) Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*, 101: 1285-1292.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673-686.

- Oliva J. M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M., Manzanares P., Ballesteros M. (2003) Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyvermyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105: 141-153.
- Saballos A. (2008) Development and utilization of sorghum as a bioenergy crop. In Genetic improvement of bioenergy crops, Vermerris W. (ed.) (2008). Springer, New York, cap. 8: 211-248.
- Salvi D. A., Aita G. M., Roberto D., Bazan V. (2010) Dilute ammonia pretreatment of sorghum and its effectiveness on enzyme hydrolysis and ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161: 67-74.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194.
- Sathesh-Prabu C., Murugesan A. G. (2011) Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 102: 2788-2792.
- Sipos B., Réczey J., Somorai Z., Kádár Z., Dienes D., Réczey K. (2009) Sweet Sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153: 151-162.
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Taherzadeh M. J., Karimi, K. (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, 2: 472-499.
- Taherzadeh M.J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 1621-1651.
- Tomás-Pejó E., Oliva J. M., Ballesteros, M. (2008) Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67: 874-888.
- UFP – Universidade Fernando Pessoa. [www.ufp.pt](http://www.ufp.pt), acedido em 08/08/2011.
- Wu L., Arakane M., Ike M., Wada M., Takai T., Gau M., Tokuyasu K. (2011) Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*, 102: 4793-4799.

- Yu Q., Zhuang X., Yuan Z., Wang W., Qi W., Wang Q., Tan X. (2011a) Step-change flow rate liquid hot water pretreatment of sweet sorghum bagasse for enhancement of total sugars recovery. *Applied Energy*, 88: 2472-2479.
- Yu Q., Zhuang X., Yuan Z., Qi W., Wang Q., Tan X. (2011b) The effect of metal salts on the decomposition of sweet sorghum bagasse in flow-through liquid hot water. *Bioresource Technology*, 102: 3445-3450.
- Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001) Fuel ethanol production from lignocelullose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 17-34.
- Zhang J., Ma X., Yu J., Zhang X., Tan T. (2011) The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, 102: 4585-4589.